

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Além da mortalidade: produtos vegetais e alvos estratégicos em colônias de
formigas-cortadeiras**

Andressa Graebin
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

ANDRESSA GRAEBIN

**Além da mortalidade: produtos vegetais e alvos estratégicos em colônias de
formigas-cortadeiras**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

Orientador: Raul N. Carvalho Guedes

Coorientadores: Terezinha M. C. D. Lucia
Karina Dias Amaral
Patricia F. Pinheiro

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G734a Graebin, Andressa, 1992-
2026 Além da mortalidade: produtos vegetais e alvos estratégicos em colônias de formigas-cortadeiras / Andressa Graebin. – Viçosa, MG, 2026.
1 tese eletrônica (135 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui apêndice.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, 2026.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.626>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Formiga-cortadeira. 2. Fungos fitopatogênicos.
3. Simbiose. 4. Inseticidas. 5. Fungicidas. 6. Essências e óleos essenciais. I. Guedes, Raul Narciso Carvalho, 1967-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.
III. Título.

CDD 22. ed. 595.796

ANDRESSA GRAEBIN

Além da mortalidade: produtos vegetais e alvos estratégicos em colônias de formigas-cortadeiras

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de setembro de 2026.

Assentimento:

Andressa Graebin
Autora

Raul Narciso Carvalho Guedes
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 15/10/2026 às 17:36:22 e pelo orientador em 15/10/2026 às 17:39:08. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **QC9Z.TRFE.LDTG** e clique no botão 'Validar documento'.

Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança para chegar até aqui.

À minha filha Bianca, meu maior motivo para seguir em frente, por ser minha inspiração diária e por dar ainda mais sentido a cada conquista. Tudo o que faço também é por você. Aos meus pais Alcir e Almerinda, pelo amor, apoio incondicional, ensinamentos e por sempre acreditarem em mim. Esta conquista também é de vocês. Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhado, pelo carinho, apoio e por tornarem essa caminhada mais leve e especial. À minha família, por todo amor, compreensão e incentivo ao longo desta trajetória.

Aos meus amigos queridos, pela amizade, carinho, incentivo e por estarem presentes nos momentos de alegria, dificuldades e incertezas. Sou imensamente grata por ter vocês em minha vida. Aos meus amigos dos meus laboratórios Ecotox e Lamob. Obrigada por tanto e por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar minha formação acadêmica e pelo ambiente que contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes, pela orientação, confiança, ensinamentos e por contribuir de forma significativa para minha formação como pesquisadora.

Às minhas coorientadoras, Dra. Karina Dias Amaral e Dra. Patrícia Fontes Pinheiro, pela contribuição, disponibilidade e pelos ensinamentos ao longo desta trajetória.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, atenção e valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho, compartilhando seus conhecimentos em um momento tão importante da minha formação.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos professores, pesquisadores, técnicos, colegas e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para minha formação e para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Esta conquista é resultado de muitas mãos, muitos ensinamentos e, sobretudo, de pessoas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada. A todos, minha eterna gratidão.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais, para que possamos temer menos."
(Marie Curie)

RESUMO

GRAEBIN, Andressa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2026. **Além da mortalidade: produtos vegetais e alvos estratégicos em colônias de formigas-cortadeiras.** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadores: Terezinha Maria Castro Della Lucia, Karina Dias Amaral e Patricia Fontes Pinheiro.

As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* constituem importantes pragas de sistemas agrícolas e florestais, cuja complexa organização social e dependência do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* dificultam o desenvolvimento de estratégias de controle. Nesse contexto, produtos de origem vegetal representam fontes promissoras de substâncias com potencial inseticida e fungicida. Esta tese teve como objetivo geral avaliar o potencial de produtos de origem vegetal para o controle de formigas-cortadeiras, integrando a síntese das evidências disponíveis e a investigação experimental de atividades inseticida e fungicida. No primeiro capítulo, foi realizada uma revisão sistemática e meta-análises sobre a atividade de fitoquímicos contra formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e o fungo simbiote *L. gongylophorus*. Foram incluídos 48 estudos, que apresentaram ampla diversidade de produtos, organismos-alvo e abordagens experimentais. As evidências indicaram atividade inseticida e fungicida dos fitoquímicos, incluindo efeitos letais e subletais sobre as formigas e inibição do crescimento e da biomassa do fungo. Entretanto, observou-se elevada heterogeneidade entre os estudos e limitada disponibilidade de informações quantitativas para alguns parâmetros, especialmente os relacionados à atividade fungicida. No segundo capítulo, foram avaliados os efeitos inseticidas e fungicidas dos óleos essenciais de *Salix babylonica*, *Eugenia uniflora*, *Melaleuca viminalis*, *Zingiber officinale* e *Piper nigrum* sobre operárias forrageadoras e jardineiras de *Atta sexdens* e *Acromyrmex subterraneus*, além de *L. gongylophorus*. Os óleos apresentaram diferentes perfis químicos, predominantemente constituídos por mono e sesquiterpenos, e as respostas variaram conforme a espécie, a casta e o óleo avaliado. De modo geral, as jardineiras apresentaram respostas mais evidentes à exposição aos óleos essenciais. O óleo de *Z. officinale* apresentou atividade fungicida em concentrações elevadas, enquanto o óleo de *M. viminalis* destacou-se pela maior toxicidade sobre operárias jardineiras, particularmente em comparação às forrageadoras. No terceiro capítulo, foi investigado o potencial inseticida de extratos foliares de *Tropaeolum majus* sobre operárias forrageadoras e jardineiras de *A. sexdens*. Entre os oito extratos avaliados, aqueles obtidos com acetato de etila, butanol e metanol apresentaram maior atividade e foram

selecionados para os ensaios de concentração–resposta. A redução da concentração foi acompanhada por diminuição da intensidade da atividade inseticida, embora os extratos tenham mantido efeito sobre as operárias nas menores concentrações avaliadas. O fracionamento biomonitorado foi direcionado à amostra de maior atividade, sendo selecionada a fração 7–11 do extrato de butanol para investigação química. Essa fração apresentou aproximadamente 45% de ésteres, com destaque para o palmitato de etila e o linoleato de etila, que também foram identificados em proporções relevantes no biodiesel utilizado em bioensaio complementar, associado a aproximadamente 80% de mortalidade. Em conjunto, os resultados demonstram o potencial de produtos de origem vegetal como fontes de substâncias com atividade sobre formigas-cortadeiras e seu fungo simbionte, além de evidenciarem a importância de considerar a diversidade química dos produtos, as diferenças entre castas e os diferentes componentes envolvidos na manutenção das colônias.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras; fitoquímicos; produtos de origem vegetal; atividade inseticida; atividade fungicida; *Leucoagaricus gongylophorus*.

ABSTRACT

GRAEBIN, Andressa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2026.
Beyond Mortality: Plant-Derived Products and Strategic Targets in Leaf-Cutting Ant Colonies. Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisers: Terezinha Maria Castro Della Lucia, Karina Dias Amaral and Patricia Fontes Pinheiro.

Leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* are important pests in agricultural and forestry systems. Their complex social organization and dependence on the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* make the development of effective control strategies particularly challenging. In this context, plant-derived products represent promising sources of compounds with insecticidal and fungicidal potential. The overall objective of this thesis was to evaluate the potential of plant-derived products for controlling leaf-cutting ants by integrating a synthesis of available evidence with experimental investigations into their insecticidal and fungicidal activities. In the first chapter, a systematic review and meta-analyses were conducted on the activity of phytochemicals against leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* and their symbiotic fungus, *L. gongylophorus*. A total of 48 studies were included, encompassing a wide diversity of products, target organisms, and experimental approaches. The available evidence indicated insecticidal and fungicidal activity of phytochemicals, including lethal and sublethal effects on ants and inhibition of fungal growth and biomass. However, significant heterogeneity among studies and limited availability of quantitative information for some parameters were observed, particularly those related to fungicidal activity. In the second chapter, the insecticidal and fungicidal effects of essential oils from *Salix babylonica*, *Eugenia uniflora*, *Melaleuca viminalis*, *Zingiber officinale*, and *Piper nigrum* were evaluated against forager and gardener workers of *Atta sexdens* and *Acromyrmex subterraneus*, as well as against *L. gongylophorus*. The essential oils exhibited distinct chemical profiles, predominantly composed of mono- and sesquiterpenes, and the responses varied according to ant species, worker caste, and the oil evaluated. Overall, gardener workers exhibited more pronounced responses to essential oil exposure. *Zingiber officinale* essential oil showed fungicidal activity at high concentrations, whereas *M. viminalis* essential oil exhibited the greatest toxicity to gardener workers, particularly when compared with foragers. In the third chapter, the insecticidal potential of leaf extracts of *Tropaeolum majus* was investigated against forager and gardener workers of *A. sexdens*. Among the eight extracts evaluated, those obtained with ethyl acetate, butanol, and methanol exhibited the greatest activity and were selected

for concentration–response assays. Decreasing concentrations were accompanied by reduced insecticidal activity, although the extracts remained active against workers even at the lowest concentrations tested. Bioassay-guided fractionation was performed using the most active sample, and fraction 7–11 of the butanol extract was selected for chemical investigation. This fraction contained approximately 45% esters, with ethyl palmitate and ethyl linoleate as major constituents. These compounds were also identified in substantial proportions in the biodiesel used in a complementary bioassay, which was associated with approximately 80% mortality. Overall, the results demonstrate the potential of plant-derived products as sources of compounds active against leaf-cutting ants and their symbiotic fungus, while also highlighting the importance of considering product chemical diversity, differences among worker castes, and the different components involved in colony maintenance.

Keywords: leaf-cutting ants; phytochemicals; plant-derived products; insecticidal activity; fungicidal activity; *Leucoagaricus gongylophorus*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1	18
RESUMO	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. METODOLOGIA	21
2.1 Estratégia de busca e seleção dos estudos	21
2.2 Critérios de elegibilidade	22
2.3 Seleção dos estudos e extração dos dados	23
2.4 Análise estatística.....	24
3. RESULTADOS.....	25
3.1 Seleção dos estudos	25
3.2 Caracterização da base de evidências incluída	27
3.3 Distribuição geográfica das evidências	28
3.4 Distribuição botânica.....	29
3.5 Distribuição química.....	30
3.6 Terpenos predominantes.....	31
3.7 Abordagens experimentais empregadas nos estudos	34
3.8 Síntese quantitativa das evidências.....	35
3.8.1 Relato de DL_{50} e CL_{50}	35
3.8.2 Efeitos subletais.....	36
4. DISCUSSÃO.....	37
4.1 Evolução e distribuição das evidências	38
4.2 Diversidade botânica e química.....	39
4.3 Compostos bioativos	40
4.4 Tendências metodológicas.....	41
4.5 Lacunas e perspectivas.....	43
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 2	50
Simple Summary.....	51
Abstract	51
1. Introduction	52

2. Materials and Methods	54
2.1 Collection and identification of botanical materials	54
2.2 Essential oil extraction and yield	54
2.3 Ant colonies	55
2.4 Toxicity bioassays with worker ants	55
2.5 Toxicity bioassays with the symbiotic fungus	56
2.6 Statistical analyses	57
3. Results	57
3.1 Chemical composition, identification, and yield of essential oils	57
3.2. Toxicity of essential oils to <i>quenquém</i> workers	59
3.3. Toxicity of essential oils to parasol leafcutter workers	60
3.4. Toxicity of essential oils to the symbiotic fungus <i>L. gongylophorus</i>	62
4. Discussion	63
References	68
CAPÍTULO 3	73
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1 Material vegetal	76
2.2 Obtenção dos extratos	77
2.3 Obtenção e manutenção das colônias de saúva-limão	77
2.4 Seleção das operárias	78
2.5 Triagem biológica dos extratos	78
2.6 Ensaios de concentração–resposta	79
2.7 Fracionamento biomonitorado	79
2.8 Bioensaios das frações	80
2.9 Caracterização química das frações	80
2.10 Relação entre composição química e atividade inseticida	81
2.11 Produção e caracterização do biodiesel	81
2.12 Avaliação da atividade inseticida do biodiesel	82
2.13 Análises estatísticas	83
3. RESULTADOS	83
3.1 Atividade inseticida dos extratos de <i>Tropaeolum majus</i>	83
3.2 Efeito da concentração sobre a atividade inseticida	84
3.2.1 Extrato de acetato de etila	85
3.2.2 Extrato de metanol	85

3.2.3 Extrato de butan-1-ol	86
3.3 Fracionamento biomonitorado e atividade inseticida das frações.....	87
3.4 Atividade inseticida do biodiesel.....	90
3.5 Comparação entre a fração de chaguinha e o biodiesel.....	92
4. DISCUSSÃO	93
5. CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS	97
CONCLUSÕES GERAIS	104
APÊNDICES	105

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* estão entre os principais insetos-praga de importância agrícola e florestal na região Neotropical (Fowler 1978; Garret et al. 2016), devido à intensa atividade de corte e transporte de material vegetal para os seus ninhos (Mueller et al., 2018). A capacidade de exploração dos recursos vegetais (Bacci et al. 2009), associada à organização social e à elevada densidade de indivíduos nas colônias (Della Lucia et al., 2014; Zanetti et al., 2008), pode resultar em danos significativos a diferentes espécies vegetais (Pereira; Santos, 2008; Feitosa-Alcantara et al., 2017), comprometendo a produtividade de sistemas agrícolas e florestais.

As formigas-cortadeiras apresentam uma relação mutualística com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Hölldobler; Wilson, 1990), que constitui a fonte de alimento fundamental para elas; por isso, são conhecidas como formigas cultivadoras de fungos (Quinlan; Cherrett, 1979; Mikheyev 2008). O material vegetal coletado pelas operárias é processado e incorporado ao jardim de fungo, estabelecendo uma relação de dependência entre as formigas e o microrganismo cultivado (Knapp, 1987).

Uma colônia madura de formigas-cortadeiras do gênero *Atta* pode ser caracterizada como um superorganismo, reunindo mais de 5 milhões de operárias, uma única rainha e uma organização social complexa, marcada por uma divisão de trabalho altamente especializada, determinada principalmente pelo tamanho e pela idade das operárias (Hölldobler; Wilson, 1990). A organização social das colônias envolve diferentes castas de operárias, que desempenham funções relacionadas ao forrageamento, transporte e processamento do material vegetal, cuidados com a prole, e à manutenção do jardim de fungo (Della Lucia, 2011). Dessa forma, a sobrevivência da colônia está associada à integração entre as formigas e o fungo simbiote, de modo que alterações em qualquer desses componentes podem interferir na manutenção da colônia.

O controle das formigas-cortadeiras é realizado principalmente por meio de iscas tóxicas (Britto et al., 2016), além de pós secos, termonebulização e gases liquefeitos (Gouvêa et al., 2011). Apesar da importância dessas ferramentas para o manejo, a utilização de determinados ingredientes ativos tem sido acompanhada por preocupações relacionadas aos efeitos sobre o ambiente e organismos não-alvo (Almeida et al., 2007; Montoya-Lerma et al., 2012), além de questões regulatórias (Gandra et al., 2021). A necessidade de alternativas aos métodos

convencionais tem estimulado a investigação de produtos de origem vegetal (Ramos et al., 2019), especialmente em razão da diversidade de substâncias produzidas pelas plantas (Tlak Gajger; Dar, 2021) e neste caso o nosso país é beneficiado pela alta diversidade vegetal.

Entre essas substâncias encontram-se metabólitos secundários que podem apresentar atividade sobre insetos e microrganismos e, conseqüentemente, potencial para aplicação no manejo de pragas (Silva et al., 2019; Perri et al., 2017; Ramos et al., 2019). A utilização de plantas como fonte de substâncias para o controle de insetos pode envolver diferentes tipos de fitoquímicos, como extratos vegetais (De Souza et al., 2012), óleos essenciais (Oliveira et al., 2017) e compostos isolados (Santos et al., 2022). Compostos terpênicos, como limoneno, linalol, α -pineno e timol, apresentam atividade inseticida comprovada e figuram entre os principais candidatos ao desenvolvimento de bioinseticidas para o controle de formigas-cortadeiras (Santos et al., 2022; Pinheiro et al., 2025). Essa diversidade de fitoquímicos amplia as possibilidades de investigação, uma vez que diferentes espécies vegetais, estruturas das plantas, métodos de extração e classes de compostos podem apresentar atividades biológicas distintas.

Nesse sentido, o estudo de produtos de origem vegetal representa uma perspectiva relevante para ampliar o conhecimento sobre alternativas ao controle das formigas-cortadeiras, considerando a complexidade das colônias e a interação estabelecida com o fungo simbiote. O aprofundamento das investigações sobre diferentes fontes vegetais e seus constituintes contribuirá na identificação de substâncias com potencial inseticida e fungicida e ainda na compreensão dos fatores associados à atividade biológica observada. Diante desse contexto, esta tese teve como objetivo geral avaliar o potencial de produtos de origem vegetal para o controle de formigas-cortadeiras, integrando a síntese das evidências disponíveis e a investigação experimental de sua atividade inseticida e fungicida.

A tese está estruturada em três capítulos. O primeiro sintetizou e quantificou as evidências sobre a atividade inseticida e fungicida de fitoquímicos vegetais contra formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Foram considerados efeitos letais e subletais sobre as formigas, além da inibição do crescimento e da biomassa do fungo e da influência de características botânicas, químicas e metodológicas sobre as evidências disponíveis. O segundo avaliou o potencial inseticida e fungicida dos óleos essenciais de *Salix babylonica*, *Eugenia uniflora*, *Melaleuca viminalis*, *Zingiber officinale* e *Piper nigrum* sobre operárias forrageadoras e jardineiras de *Atta sexdens* e *Acromyrmex*

subterraneus e sobre *L. gongylophorus*, relacionando as respostas biológicas à composição química dos óleos. O terceiro avaliou o potencial inseticida de extratos de *Tropaeolum majus* sobre operárias forrageadoras e jardineiras de *A. sexdens*, incluindo a triagem de extratos obtidos com diferentes solventes, a avaliação dos mais ativos em diferentes concentrações e o fracionamento biomonitorado, com o objetivo de relacionar a atividade inseticida ao perfil químico dos extratos e frações.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. A.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* R.E. Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *BioAssay*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2007.
- BACCI JUNIOR, M.; SOLOMON, S. E.; MUELLER, U. G.; MARTINS, V. G.; CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E.; SILVA-PINHATI, A. C. O. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 51, n. 3, p. 427–437, 2009. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.11.005.
- BRITTO, J. S.; FORTI, L. C.; DE OLIVEIRA, M. A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International Journal of Research in Environmental Studies*, v. 3, p. 11–92, 2016.
- DE SOUZA, M. D.; FILHO, O. P.; CALDEIRA, S. F.; DORVAL, A.; SOUSA, N. J. Development in vitro of the symbiotic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) in culture medium with different plant extracts. *Ciência Rural*, v. 42, n. 9, 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012005000058.
- DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011.
- DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.
- FEITOSA-ALCANTARA, R. B.; BACCI, L.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; SILVA, I. M. D. A.; SOARES, C. A.; SANTOS, A. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Essential oils of *Hyptis pectinata* chemotypes: isolation, binary mixtures and acute toxicity on leaf-cutting ants. *Molecules*, v. 22, n. 4, p. 621, 2017.
- FOWLER, H. G. Foraging trails of leaf-cutting ants. *Journal of the New York Entomological Society*, v. 86, p. 132–136, 1978.

GANDRA, L. C.; AMARAL, K. D.; COUCEIRO, J. C.; GUEDES, R. N. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Does resource-mediated stress affect colony personality in leaf-cutting ants? *Pest Management Science*, v. 77, n. 1, p. 96–103, 2021. DOI: 10.1002/ps.6033.

GARRET, R. W.; CARLSON, K. A.; GOGGANS, M. S.; NESSON, M. H.; SHEPARD, C. A.; SCHOFIELD, R. M. S. Leaf processing behavior in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *Royal Society Open Science*, v. 3, p. 150111, 2016.

GOUVÊA, S. M.; CARVALHO, G. A.; PICANÇO, M. C.; MORAIS, E. G. F.; BENEVENUTE, J. S.; MOREIRA, M. D. Lethal and behavioral effects of Amazonian plant extracts on leaf-cutting ant (Hymenoptera: Formicidae) workers. *Sociobiology*, v. 57, n. 1, p. 93, 2011.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The ants*. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 1990. 732 p.

KNAPP, J. J. Studies of the foraging behaviour of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) in Guadeloupe. 1987. MSc Report – University of Southampton, Southampton, UK, 1987.

MELO, C. R.; OLIVEIRA, B. M. S.; SANTOS, A. C. C.; SILVA, J. E.; RIBEIRO, G. T.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. A.; BACCI, L. Synergistic effect of aromatic plant essential oils on the ant *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) and antifungal activity on its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 14, p. 17303–17313, 2020.

MENEGHETTI, C.; REBELO, R. A.; VITORINO, M. D. Effect of essential oil from leaves of *Drimys angustifolia* in colonies of *Acromyrmex* spp. in *Pinus taeda* planting. *Floresta*, v. 45, n. 4, 2015.

MIKHEYEV, A. S. History, genetics and pathology of a leaf-cutting ant introduction: a case study of the Guadeloupe invasion. *Biological Invasions*, v. 10, p. 467–473, 2008.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*, v. 58, n. 3, p. 225–247, 2012.

MUELLER, U. G.; KARDISH, M. R.; ISHAK, H. D.; WRIGHT, A. M.; SOLOMON, S. E.; BRUSCHI, S. M.; CARLSON, A. L.; BACCI JUNIOR, M. Phylogenetic patterns of ant-fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. *Molecular Ecology*, v. 27, p. 2414–2437, 2018.

OLIVEIRA, B. M. S.; MELO, C. R.; ALVES, P. B.; SANTOS, A. A.; SANTOS, A. C. C.; SANTANA, A. D. S.; [demais autores]. Essential oil of *Aristolochia trilobata*: synthesis, routes of exposure, acute toxicity, binary mixtures and behavioral effects on leaf-cutting ants. *Molecules*, 2017.

PEREIRA, J. M. M.; SANTOS, G. P. Aspectos socioeconômicos do setor florestal brasileiro. *Informe Agropecuário*, v. 29, n. 242, p. 7–13, 2008.

PERRI, D.; GOROSITO, N.; FERNANDEZ, P.; BUTELER, M. Plant-based compounds with potential as push-pull stimuli to manage behavior of leaf-cutting ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 163, n. 2, p. 150–159, 2017. DOI: 10.1111/eea.12574.

PINHEIRO, H. S. S.; CALAZANS, C. C.; MASIULIONIS, V. E.; ANDRADE, V. S.; CARVALHO, T. S.; GOIS, I. B.; RIBEIRO, G. T.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; BACCI, L. Potential of alternative control of leaf-cutting ants using essential oils: a systematic review. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 27, n. 4, p. 497–511, 2025. DOI: 10.1111/afe.12688.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Ecological Entomology*, v. 4, p. 151–160, 1979.

RAMOS, V. M.; LEITE, R. G. F.; ALMEIDA, V. T. DE; CAMARGO, R. DA S.; CRUZ, J. V. S.; LEÃO, R. M. DE; PRADO, M. V.; PEREIRA, M. C. S. Bioactivity of *Asclepias curassavica*, *Equisetum* spp. and *Rosmarinus officinalis* extracts against leaf-cutting ants. *Sociobiology*, v. 66, n. 4, p. 536–544, 2019. DOI: 10.13102/sociobiology.v66i4.4271.

SANTOS, N. C.; DA SILVA, J. E.; SANTOS, A. C. C.; DANTAS, J. DE O.; TAVARES, S. R. S. A.; ANDRADE, V. S.; OLIVEIRA, S. D. DA S.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; BACCI, L. Bioactivity of essential oils from *Croton grewoides* and its major compounds: toxicity to soybean looper *Chrysodeixis includens* and selectivity to the predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, n. 7, p. 18798–18809, 2023. DOI: 10.1007/s11356-022-23414-w.

SILVA, T. D.; CAMARGO, A. D.; SANCHES, L. A.; GARLET, J. *Musa acuminata* pseudostem extract on the control of *Atta sexdens rubropilosa*. *Bioscience Journal*, v. 35, n. 2, 2019.

TLAK GAJGER, I.; DAR, S. A. Plant allelochemicals as sources of insecticides. *Insects*, v. 12, p. 189, 2021. DOI: 10.3390/insects12030189.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; MENDONÇA, L. A.; MATTOS, J. O. S.; RIZENTAL, M. S. Eficiência de produtos termonebulígenos no controle de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em plantio de eucalipto. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 4, p. 1313–1316, 2008.

CAPÍTULO 1

RESUMO

Graebin, Andressa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro, 2026.
Além da mortalidade: fitoquímicos, colônias de formigas-cortadeiras — revisão sistemática e meta-análise. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.
Coorientadoras: Karina Dias Amaral e Patrícia Fontes Pinheiro.

RESUMO

As formigas-cortadeiras estão entre as principais pragas de sistemas agrícolas e florestais neotropicais, e seu controle depende sobretudo de iscas formuladas com inseticidas sintéticos. Restrições regulatórias e certificadoras, associadas a preocupações ambientais e à busca por alternativas de menor impacto, têm ampliado o interesse por compostos de origem vegetal. Esta revisão sistemática e meta-análise sintetizou as evidências sobre a atividade inseticida e fungicida de extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados contra formigas-cortadeiras, saúvas (*Atta*) e quenquéns (*Acromyrmex*), e seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*. As buscas foram realizadas nas bases Scopus e Web of Science, desde o início da indexação até 31 de março de 2026. Dos 229 registros identificados, 48 estudos atenderam aos critérios de elegibilidade. As publicações, concentradas principalmente no Brasil e mais frequentes a partir de 2010, envolveram 59 famílias botânicas, com destaque para Myrtaceae, Euphorbiaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Apocynaceae e Meliaceae. Extratos vegetais corresponderam a 46% dos produtos avaliados, seguidos por compostos isolados (33%) e óleos essenciais (21%). Os terpenos foram a classe química mais investigada. Predominaram ensaios laboratoriais com operárias, enquanto estudos com castas distintas, colônias e fungo simbionte foram pouco frequentes. A síntese quantitativa revelou baixa frequência de estudos que avaliaram ou relataram DL_{50} e CL_{50} , além de maior frequência de avaliações de efeitos subletais em quenquéns do que em saúvas. Entre os terpenos, os estudos que avaliaram efeitos subletais foram mais frequentes do que os que não os avaliaram, sem diferenças entre os gêneros de formigas-cortadeiras. As evidências indicam que fitoquímicos podem afetar formigas-cortadeiras e o fungo simbionte por vias letais, subletais e fungicidas; contudo, a literatura ainda se concentra em respostas individuais e pouco explora o funcionamento da colônia como superorganismo. Avanços na área dependem de estudos que integrem castas, transporte e distribuição de iscas, efeitos sobre o fungo cultivado e desfechos em nível de colônia.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras; fitoquímicos; atividade inseticida; atividade fungicida; *Leucoagaricus gongylophorus*; terpenos; cienciometria.

1. INTRODUÇÃO

A interação entre plantas e insetos constitui uma das relações ecológicas mais antigas dos ecossistemas terrestres, com registros que remontam a mais de 400 milhões de anos (López-Carretero et al., 2014; Labandeira et al., 2014). Entre essas relações está a herbivoria, que embora seja um tipo de interação que pode favorecer a ambos os organismos envolvidos, promove também perdas a atividades de produção vegetal. Devido a esse aspecto, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra herbívoros, entre os quais se destaca a produção de metabólitos secundários, importantes componentes da defesa química vegetal, capazes de reduzir a herbivoria por meio de seus efeitos tóxicos sobre esses organismos (Howe e Jander, 2008; Taiz et al., 2017). Esses compostos podem ainda apresentar atividades inseticidas, antifúngicas e fagoinibidoras, com efeitos sobre uma diversidade de organismos, incluindo fungos, bactérias e vírus (Ninkuu et al., 2021; Pinheiro et al., 2025). Em razão dessas características, os fitoquímicos têm despertado crescente interesse como fonte de moléculas bioativas para o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis de manejo de insetos-praga e menos dependentes de pesticidas sintéticos (Haddi et al. 2020).

A intensificação da agricultura e a expansão dos sistemas de produção têm ampliado as oportunidades de dano por diversas espécies de insetos-praga. Entre elas, as formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* constituem os herbívoros polípagos mais comuns da região Neotropical e figuram entre as principais pragas de sistemas agrícolas e florestais (Della Lucia et al., 2014). Sua ampla distribuição na América do Sul e na América Central, onde só não ocorrem no Chile, aliada à capacidade de remover grandes quantidades de material vegetal, explica sua relevância econômica (Silva et al., 2019; Zanetti et al., 2014). Nesse contexto, o controle químico baseado em inseticidas sintéticos consolidou-se como uma das principais estratégias de manejo.

Entre as abordagens empregadas, destacam-se as iscas formuladas com sulfluramida, fipronil e, mais recentemente, isocicloseram, cuja elevada eficácia tem sustentado sua ampla utilização no controle de formigas-cortadeiras (Della Lucia et al., 2014; Britto et al., 2016; Zanetti et al., 2024; Cruz et al. 2026). Contudo, a disponibilidade de ingredientes ativos compatíveis com a certificação florestal é limitada. O *Forest Stewardship Council* (FSC), por exemplo, restringiu o uso de importantes inseticidas utilizados no manejo de pragas florestais,

como fipronil, deltametrina e sulfluramida (Lemes et al., 2017). Além das limitações impostas pelos órgãos certificadores, o uso intensivo de pesticidas está associado à seleção de populações resistentes, à contaminação ambiental, aos efeitos adversos sobre organismos não-alvo e aos potenciais riscos à saúde humana (Hebling et al., 2000; Boulogne et al., 2018; Guedes et al., 2016, 2026a,b). A busca por alternativas de controle mais seguras e ambientalmente compatíveis torna-se, assim, necessária.

Nesse cenário, os fitoquímicos destacam-se como uma alternativa promissora em razão da diversidade de compostos bioativos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas (Feitosa-Alcantara et al., 2017). Extratos vegetais (Boulogne et al., 2012; Diaz Napal et al., 2015), óleos essenciais (Brito et al., 2020; Melo et al., 2020) e compostos isolados (Godoy et al., 2005; Hebling et al., 2000) representam importantes fontes de metabólitos secundários com potencial para o controle de formigas-cortadeiras e de seus fungos simbioses. Entre as principais classes de compostos bioativos destacam-se alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (Van Bael et al., 2011; Infante-Rodríguez et al., 2020).

Essa diversidade química é particularmente interessante em formigas-cortadeiras, pois o alvo de manejo não se restringe às operárias individualmente expostas, mas abrange uma colônia socialmente organizada e dependente de um fungo cultivado. Dependendo do composto, da formulação e da via de exposição, podem ocorrer efeitos inseticidas, fisiológicos ou comportamentais sobre as formigas, bem como ação fungistática ou fungicida sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, que é o fungo cultivado pelas formigas e que sustenta a nutrição da colônia (Melo et al., 2020; Amaral et al., 2018; Dantas et al., 2023; Araújo et al., 2022). Em consequência, um mesmo fitoquímico pode afetar diferentes componentes do sistema formiga-fungo, embora a relevância de cada efeito para a supressão da colônia ainda dependa de avaliação cuidadosa.

Embora o interesse pelo uso de fitoquímicos no manejo de formigas-cortadeiras tenha aumentado nas últimas décadas (Magalhães, 2025; Pinheiro et al., 2025), a literatura disponível reúne espécies vegetais, classes de metabólitos secundários, organismos-alvo, vias de exposição e critérios de avaliação bastante diversos. Essa dispersão dificulta não apenas a integração das evidências, mas também a identificação de quais abordagens são mais informativas para o manejo de uma colônia social. Em particular, avaliações restritas à mortalidade de operárias podem não captar efeitos sobre comportamento, divisão de trabalho, manutenção do fungo simbiote e funcionamento coletivo da colônia.

Nesse contexto, a análise cienciométrica permite caracterizar quantitativamente a produção científica, evidenciando padrões temporais e geográficos, bem como a distribuição dos estudos entre fontes vegetais, classes de compostos e abordagens experimentais. Associada à revisão sistemática, essa abordagem possibilita compreender a evolução do campo, identificar concentrações de pesquisa e apontar lacunas de conhecimento. Neste estudo, a análise cienciométrica complementou a síntese das evidências sobre a atividade inseticida e fungicida dos fitoquímicos, permitindo caracterizar como essas pesquisas têm se distribuído e evoluído ao longo do tempo.

Diante desse cenário, esta revisão sistemática e meta-análise foi conduzida para sintetizar e quantificar as evidências disponíveis sobre a atividade inseticida e fungicida de fitoquímicos de origem vegetal contra formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*. Foram examinados os efeitos relatados sobre mortalidade, parâmetros toxicológicos e respostas subletais das formigas, bem como sobre a inibição do crescimento e a biomassa do fungo. Também se investigou como características botânicas, químicas e metodológicas se distribuem entre os estudos e quais lacunas podem limitar a seleção de fitoquímicos com real potencial de uso em iscas formicidas ou em outras estratégias de manejo.

Partiu-se das seguintes hipóteses: (i) a produção científica sobre fitoquímicos aplicados ao manejo de formigas-cortadeiras apresentou crescimento temporal, permanecendo concentrada em determinados países, famílias botânicas e classes de metabólitos secundários; (ii) os estudos apresentam padrões metodológicos distintos quanto aos organismos-alvo, aos tipos de produtos vegetais e aos desfechos experimentais avaliados; e (iii) as evidências qualitativas e quantitativas disponíveis são heterogêneas quanto à ocorrência de efeitos inseticidas e fungicidas, cuja ocorrência e expressão variam conforme as características do produto, do organismo-alvo e das condições experimentais.

2. METODOLOGIA

2.1 Estratégia de busca e seleção dos estudos

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura, seguida de meta-análise, para avaliar a atividade inseticida e fungicida de fitoquímicos de origem vegetal sobre formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, bem como sobre o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. O estudo foi conduzido e relatado de acordo com as recomendações do

Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Page et al., 2021).

As buscas bibliográficas foram realizadas nas bases de dados Scopus e Web of Science, abrangendo o período desde o início da indexação de cada base até 31 de março de 2026. Foram considerados artigos científicos originais publicados em inglês, português e espanhol, sem restrição quanto à área temática.

A estratégia de busca foi elaborada a partir da combinação de descritores relacionados às formigas-cortadeiras, ao fungo simbionte e aos fitoquímicos de origem vegetal, utilizando operadores booleanos (AND e OR) aplicados aos campos de título, resumo e palavras-chave. A seguinte estratégia foi utilizada: ("Atta" OR "Acromyrmex" OR "Amoimyrmex" OR "leaf-cutter ant*" OR "leafcutter ant*" OR "leaf-cutting ant*" OR "Leucoagaricus gongylophorus") AND ("essential oil*" OR "plant extract*" OR "phytochemical*" OR "secondary metabolite*" OR "bioinsecticide*" OR "botanical insecticide*" OR "biopesticide*" OR "natural insecticide*" OR "phytoinsecticide*" OR "natural molecule*" OR "natural compound*").

Os registros recuperados foram exportados das duas bases de dados e consolidados em uma única base para a identificação e remoção de duplicatas. Ao término dessa etapa, foram identificados 229 registros, dos quais 89 correspondiam a duplicatas, resultando em 140 estudos para a etapa de triagem e aplicação dos critérios de elegibilidade. O processamento dos registros e dos documentos em texto completo foi realizado utilizando as ferramentas computacionais descritas por Dutra et al. (2023), incluindo procedimentos de padronização, identificação e remoção de duplicidades e conversão dos documentos para formato de texto, de modo a facilitar sua avaliação e a extração das informações de interesse. O processo de identificação, seleção, elegibilidade e inclusão dos estudos foi apresentado por meio de um fluxograma elaborado segundo as recomendações do PRISMA 2020 (Page et al., 2021).

2.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios de elegibilidade foram definidos previamente com base na estratégia PICO (População, Intervenção, Comparador e Desfechos), apresentada na Tabela 1, visando selecionar estudos capazes de responder à pergunta de pesquisa e garantir a consistência das sínteses qualitativa e quantitativa.

Tabela 1. Estratégia PICO utilizada na elaboração da pergunta de pesquisa.

Elemento	Descrição
P (População)	Formigas-cortadeiras dos gêneros <i>Atta</i> e <i>Acromyrmex</i> e/ou o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .
I (Intervenção)	Fitoquímicos de origem vegetal, incluindo extratos brutos, extratos fracionados, óleos essenciais e compostos isolados.
C (Comparador)	Grupo controle negativo (água, solvente ou outro veículo), utilizado para comparação dos efeitos biológicos dos fitoquímicos.
O (Desfechos)	Inseticidas: mortalidade (%), dose letal mediana (DL ₅₀), concentração letal mediana (CL ₅₀) e efeitos subletais (comportamento, forrageamento, locomoção e biologia). Fungicidas: inibição do crescimento micelial (%), taxa de crescimento e biomassa de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .

2.3 Seleção dos estudos e extração dos dados

Após a aplicação da estratégia de busca e da remoção dos registros duplicados, os estudos foram selecionados em três etapas: (i) leitura dos títulos e resumos; (ii) leitura na íntegra dos artigos potencialmente elegíveis; e (iii) aplicação dos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. O processo de seleção foi conduzido por dois revisores independentes, e as divergências foram resolvidas por consenso ou, quando necessário, por um terceiro revisor. O processo de seleção foi documentado por meio de um fluxograma elaborado conforme as recomendações do PRISMA (Moher et al., 2009; Page et al., 2021).

Todos os estudos que atenderam aos critérios de elegibilidade e apresentaram pelo menos um desfecho relacionado à atividade inseticida e/ou fungicida de fitoquímicos de origem vegetal sobre formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e/ou sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* foram incluídos na síntese qualitativa. Para a síntese quantitativa (meta-análise), foram considerados apenas os estudos que apresentaram informações suficientes para classificar a presença ou ausência da avaliação ou do relato dos parâmetros de interesse, ou que permitissem essa classificação a partir das informações disponíveis em tabelas e gráficos. Os estudos elegíveis que não apresentaram essas informações permaneceram exclusivamente na síntese qualitativa.

Os dados dos estudos incluídos foram extraídos por meio de uma planilha padronizada, elaborada especificamente para esta revisão sistemática. Para cada estudo, foram registradas informações sobre os autores e o ano de publicação, bem como sobre o país de realização do estudo ou, quando essa informação não estava disponível, o país de origem dos autores com o

objetivo de caracterizar a distribuição geográfica das evidências. Os países identificados foram posteriormente representados em um mapa, o que permitiu visualizar a distribuição espacial dos estudos incluídos na revisão. Também foram extraídas informações referentes à família e à espécie botânica, ao tipo de fitoquímico avaliado (extrato vegetal, óleo essencial ou composto isolado), ao grupo químico, ao composto isolado, quando aplicável, e à parte da planta utilizada. Em relação aos organismos avaliados, foram registrados o organismo-alvo e a unidade experimental, bem como o sistema experimental empregado (laboratório, semicampo ou campo) e o método de aplicação.

Para a caracterização das condições experimentais, foram registradas a dose ou concentração utilizada e os respectivos desfechos avaliados. Para os ensaios com formigas, foram considerados mortalidade, DL_{50} , CL_{50} e efeitos subletais. Para os ensaios envolvendo o fungo simbionte, foram registradas inibição do crescimento micelial, taxa de crescimento e biomassa fúngica. Também foram extraídos os parâmetros estatísticos disponíveis nos estudos, incluindo média, desvio padrão, erro padrão, intervalo de confiança e tamanho amostral.

2.4 Análise estatística

Foram realizadas sínteses quantitativas baseadas em variáveis binárias para caracterizar a frequência de avaliação ou relato dos diferentes parâmetros e desfechos entre os estudos incluídos. Em todas as análises, os estudos foram classificados de forma binária como “Sim” ou “Não”, de acordo com a presença ou ausência da avaliação do parâmetro ou desfecho de interesse. A razão de riscos (*Risk Ratio* – RR) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram utilizados como medidas de efeito. As estimativas foram combinadas utilizando um modelo de efeitos aleatórios (*random-effects model*), considerando a variabilidade entre os estudos. Nesse contexto, as estimativas combinadas expressam a frequência relativa de estudos que avaliaram ou relataram determinado parâmetro, e não a magnitude biológica direta da toxicidade ou da atividade fungicida dos fitoquímicos.

Para os parâmetros toxicológicos, foram realizadas sínteses quantitativas binárias para CL_{50} e DL_{50} , considerando “Sim” quando o estudo avaliou ou reportou o respectivo parâmetro e “Não” quando não o avaliou ou não o reportou. As análises foram organizadas segundo os métodos de aplicação dos fitoquímicos, incluindo contato, ingestão e fumigação.

Para os efeitos subletais, os estudos foram classificados como “Sim” quando avaliaram esse tipo de efeito e como “Não” quando não o avaliaram. A análise foi realizada inicialmente de forma global e, posteriormente, segundo o gênero das formigas-cortadeiras (*Atta* e

Acromyrmex). Também foi realizada uma análise de subgrupo considerando os estudos que avaliaram terpenos, permitindo verificar a frequência de estudos que investigaram efeitos subletais associados a essa classe química.

A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada pelo teste Q de Cochran e pelos índices H e I². O índice I² foi utilizado para quantificar a proporção da variabilidade total atribuível à heterogeneidade entre os estudos. A variância entre os estudos (τ^2) foi estimada pelo método de DerSimonian–Laird, utilizando-se a variância inversa para a combinação das estimativas.

Foram excluídos das respectivas sínteses quantitativas os estudos que não apresentaram informações suficientes para a classificação binária do parâmetro ou do desfecho avaliado. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R versão 3.5.1 (R Development Core, Viena, Áustria) com os pacotes “meta”, “metafor” e “stats” (R Core Team, 2020; Schwarzer et al., 2015). Os resultados das meta-análises foram apresentados graficamente por meio de *forest plots*.

3. RESULTADOS

3.1 Seleção dos estudos

A busca nas bases de dados identificou 229 registros, dos quais 89 foram removidos por duplicidade. Após a triagem dos 140 registros remanescentes, 91 foram excluídos por não atenderem aos critérios de elegibilidade, resultando em 49 artigos potencialmente elegíveis, dos quais um não estava disponível para acesso. Assim, 48 estudos foram incluídos na revisão sistemática e meta-análise, sendo 40 dedicados às formigas-cortadeiras, 15 ao fungo simbiote e 7 a ambos os componentes do sistema. Os estudos forneceram dados para as análises de CL, DL e de efeitos subletais, enquanto, para o fungo simbiote, foram identificados 12 estudos que avaliaram crescimento fúngico e três que avaliaram biomassa, com IC₅₀ reportada em um estudo para cada parâmetro (**Figura 1**).

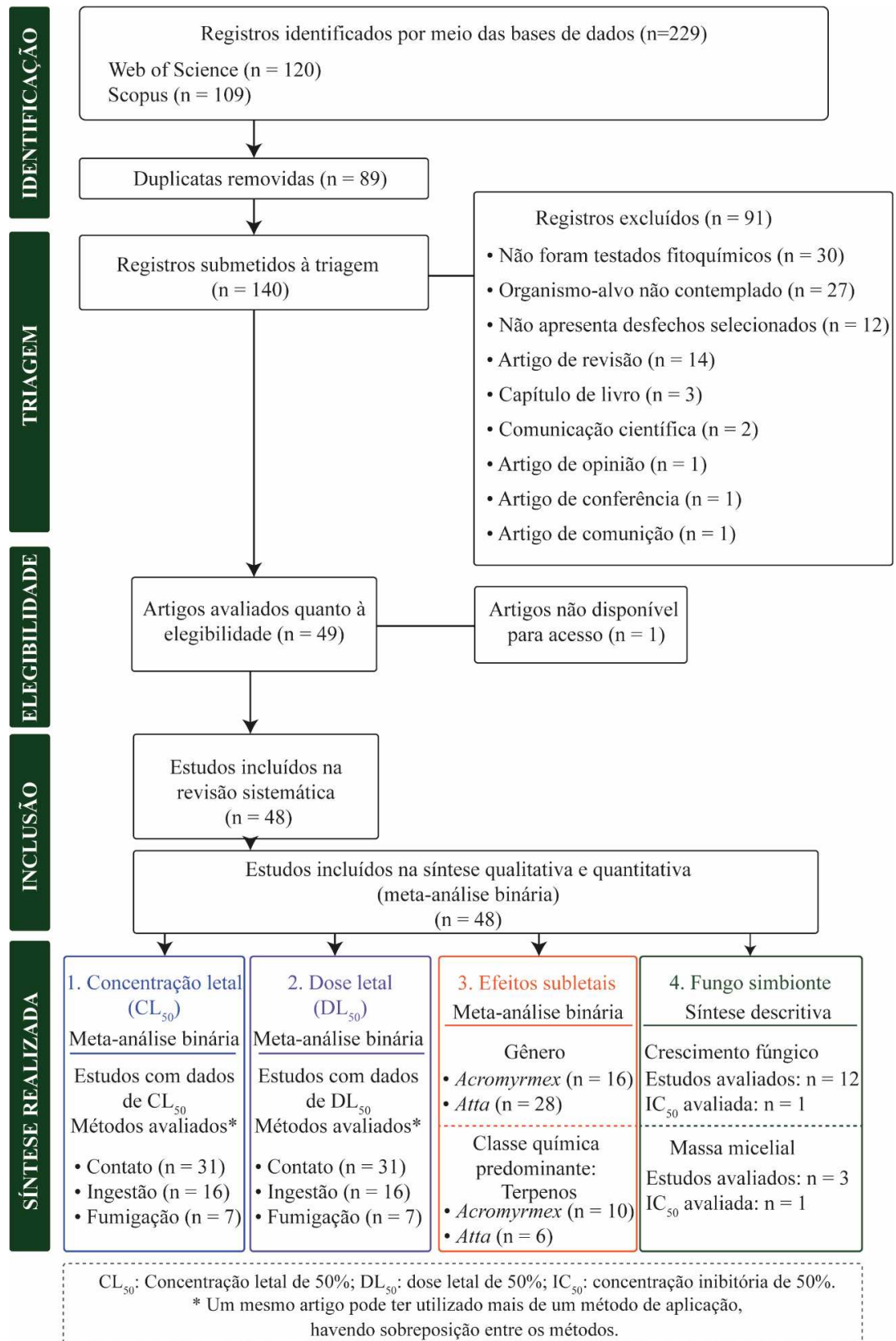


Figura 1 - Fluxograma do processo de identificação, triagem, avaliação da elegibilidade e inclusão dos estudos na revisão sistemática, conforme as recomendações do PRISMA 2020. São apresentados os desfechos avaliados e o número de estudos incluídos em cada síntese: concentração letal mediana (CL₅₀), dose letal mediana (DL₅₀), efeitos subletais e efeitos sobre o fungo simbiote, por meio de meta-análises e síntese descritiva.

3.2 Caracterização da base de evidências incluída

Os 48 estudos incluídos na revisão sistemática foram publicados entre 2002 e 2025, revelando uma tendência de crescimento da produção científica sobre o uso de fitoquímicos no controle de formigas-cortadeiras e do fungo simbionte *L. gongylophorus*. Embora as primeiras publicações tenham sido esporádicas, o número de estudos aumentou a partir de 2010, com maior concentração de publicações nos anos mais recentes. Além disso, a maior parte dos estudos investigou a atividade inseticida sobre formigas-cortadeiras, enquanto um número reduzido concentrou-se exclusivamente na atividade fungicida. Também foram identificados estudos que avaliaram simultaneamente ambos os organismos-alvo (**Figura 2A**).

Os fitoquímicos avaliados foram obtidos de uma ampla diversidade de espécies vegetais pertencentes a diferentes famílias botânicas. Entre as mais frequentemente investigadas destacaram-se Euphorbiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Apocynaceae, Lamiaceae e Meliaceae, enquanto as demais famílias apresentaram menor frequência de ocorrência (**Figura 2B**). Quanto ao tipo de fitoquímico empregado, predominaram os extratos vegetais (46%), seguidos pelos compostos isolados (33%) e pelos óleos essenciais (21%) (**Figura 2C**).

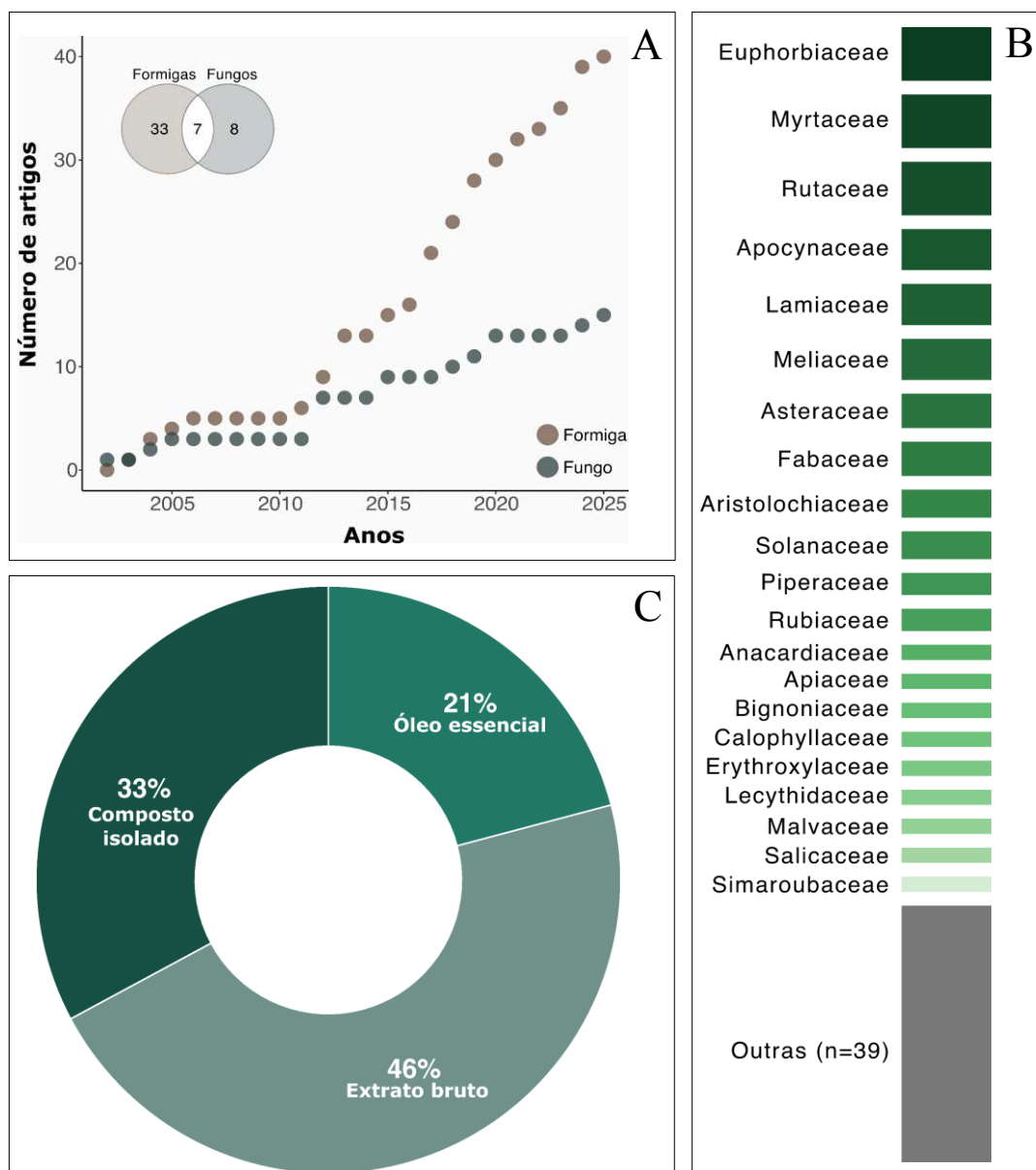


Figura 2 - (A) Número acumulado de estudos publicados entre 2002 e 2025 sobre fitoquímicos avaliados contra formigas-cortadeiras e/ou o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*; (B) proporção dos tipos de fitoquímicos avaliados; e (C) famílias botânicas mais frequentemente investigadas.

3.3 Distribuição geográfica das evidências

Os estudos incluídos na revisão sistemática foram realizados em diferentes países, com maior concentração de publicações no Brasil. Nas Américas, foram identificados estudos realizados na Argentina, Colômbia, Estados Unidos e México, além do Brasil, responsável pela maior parcela das publicações identificadas (**Figura 3**). Também foram localizados dois estudos realizados em Guadalupe (França), na região do Caribe.

Origem dos artigos

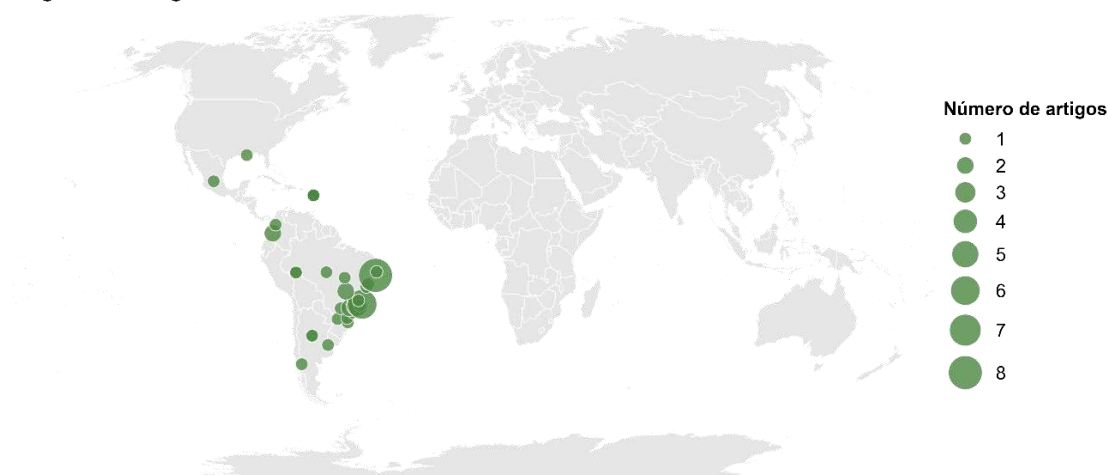


Figura 3 - Distribuição geográfica mundial dos estudos incluídos na revisão sistemática sobre a atividade inseticida e fungicida de fitoquímicos de origem vegetal contra formigas-cortadeiras e o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. A localização dos estudos corresponde aos locais de realização das pesquisas ou, na ausência dessa informação, aos países de origem dos autores.

3.4 Distribuição botânica

Foram identificadas 59 famílias botânicas entre os estudos incluídos na revisão sistemática, distribuídas entre investigações conduzidas com os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, bem como com o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. Observou-se que algumas famílias botânicas foram avaliadas exclusivamente contra um dos organismo-alvo, enquanto outras estiveram associadas a dois ou mais organismos, sugerindo abordagens de investigação distintas na literatura.

As famílias Myrtaceae, Euphorbiaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Apocynaceae, Meliaceae, e Asteraceae concentraram o maior número de estudos, ao passo que as demais foram representadas por menor frequência. A distribuição das famílias botânicas em relação aos organismos-alvo é apresentada na **figura 4**.

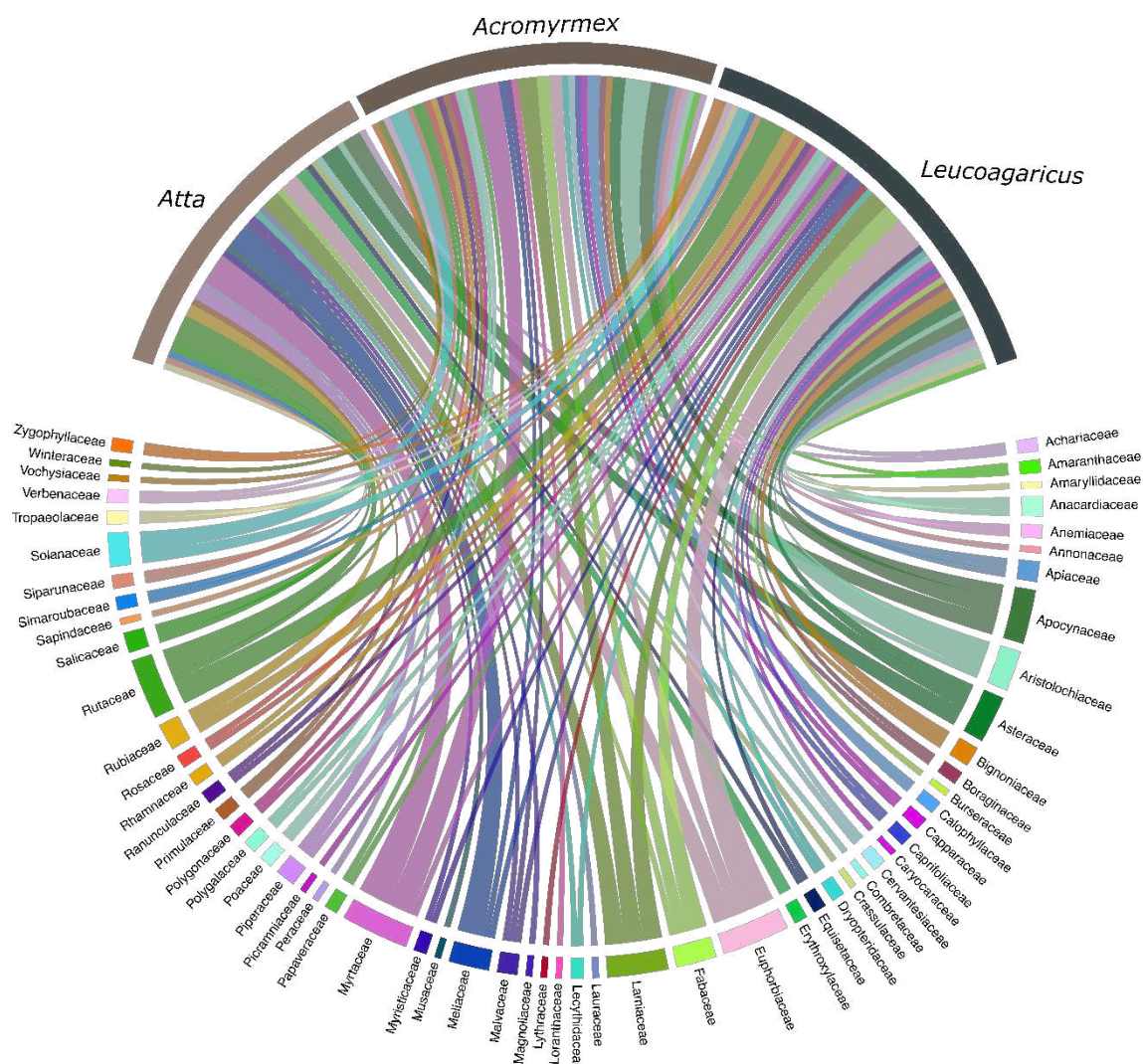


Figura 4 - Diagrama de acordes que representa as associações entre famílias botânicas e organismos-alvo (i.e. *Atta*, *Acromyrmex* e *Leucoagaricus gongylophorus*), nos estudos incluídos na revisão sistemática. O comprimento dos arcos periféricos e a espessura das faixas de conexão são proporcionais ao número de estudos que avaliaram fitoquímicos de cada família vegetal contra cada organismo-alvo. Foram incluídos 48 estudos na revisão sistemática, sendo representadas na figura 110 associações família botânica–organismo-alvo.

3.5 Distribuição química

Os estudos incluídos na revisão sistemática permitiram identificar 11 grupos químicos associados aos fitoquímicos de origem vegetal avaliados em formigas-cortadeiras e *Leucoagaricus gongylophorus*. Os grupos químicos registrados compreenderam terpenos, alcaloides, aldeídos, cumarinas, ésteres, fenilpropanoides, flavonoides, lactonas, lignanas, limonoides e organosulfurados. Entre as classes químicas representadas, os terpenos predominaram nas associações com os gêneros de formigas *Atta* e *Acromyrmex*, enquanto também estiveram entre as classes químicas mais estudadas em relação ao fungo *Leucoagaricus*. As demais classes apresentaram menor frequência de ocorrência e distribuição

mais restrita entre os organismos-alvo. A distribuição dos grupos químicos em relação às famílias botânicas e aos organismos-alvo é apresentada na **figura 5**.

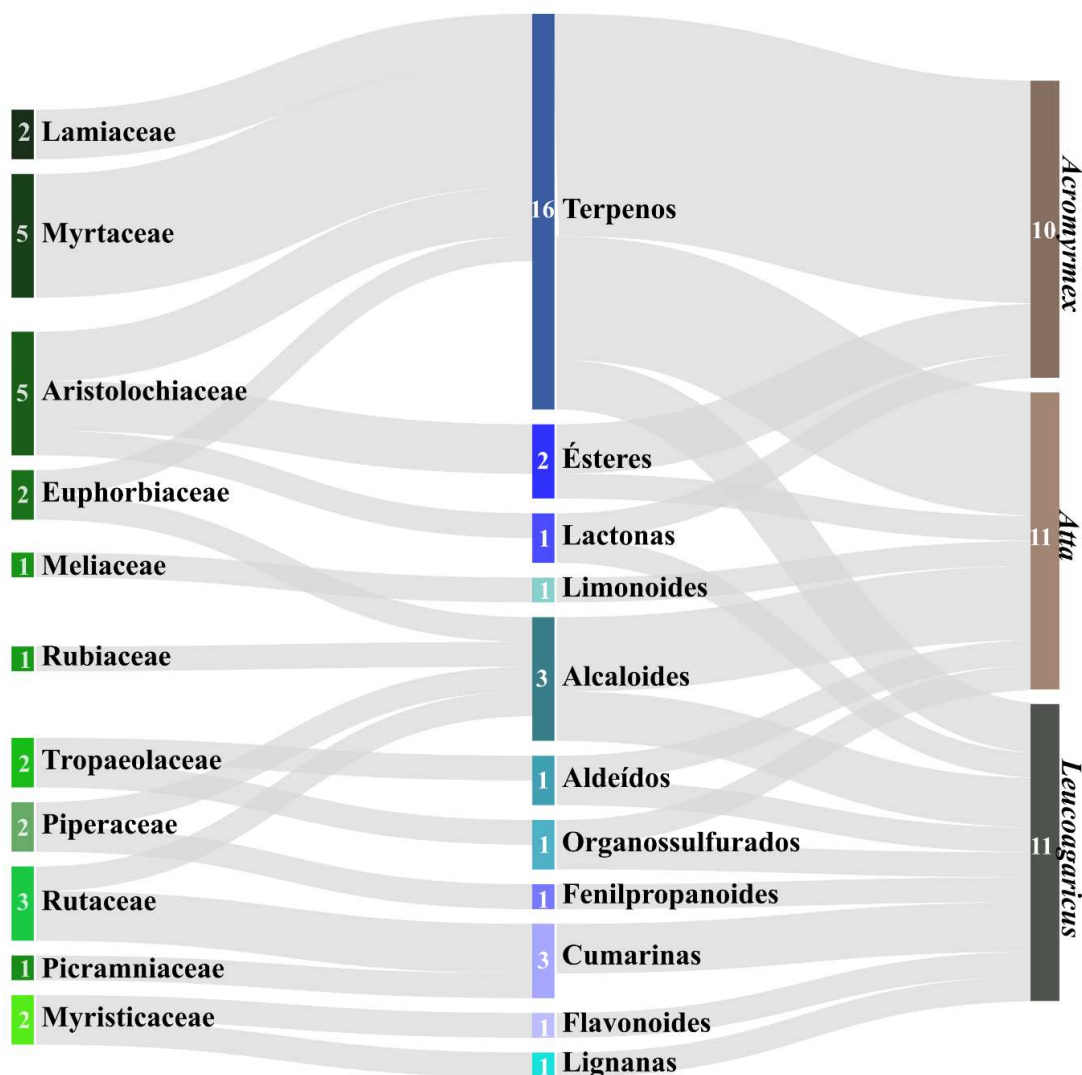


Figura 5 - Diagrama de relações entre famílias botânicas, classes químicas dos compostos isolados e organismos-alvo (i.e. *Atta*, *Acromyrmex* e *Leucoagaricus gongylophorus*), avaliados na revisão sistemática. A espessura das barras e das linhas de conexão é proporcional ao número de estudos que associaram cada família vegetal às respectivas classes químicas, compostos isolados e organismos-alvo. Foram incluídos 48 estudos na revisão sistemática, sendo representadas na figura 36 associações. Um mesmo estudo pode contribuir com mais de uma família botânica, classe química, composto isolado e/ou organismo-alvo.

3.6 Terpenos predominantes

Em razão da predominância dos terpenos entre os grupos químicos identificados, foi realizada uma análise detalhada dos compostos pertencentes a essa classe. Os estudos incluídos na revisão sistemática registraram a avaliação de diferentes terpenos sobre os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Os compostos isolados mais frequentemente investigados foram 1,8-cineol, (E)-pinocarveol, α -pineno, β -cariofileno, β -eudesmol, cânfora, calamusenona, citral, elemol, farnesol, isopulegol, limoneno, linalol,

óxido de cariofileno, p-cimeno e timol, conforme registrado nos estudos analisados. A distribuição desses compostos em relação aos organismos-alvo é apresentada na **figura 6** e a estrutura química é representada na **figura 7**.

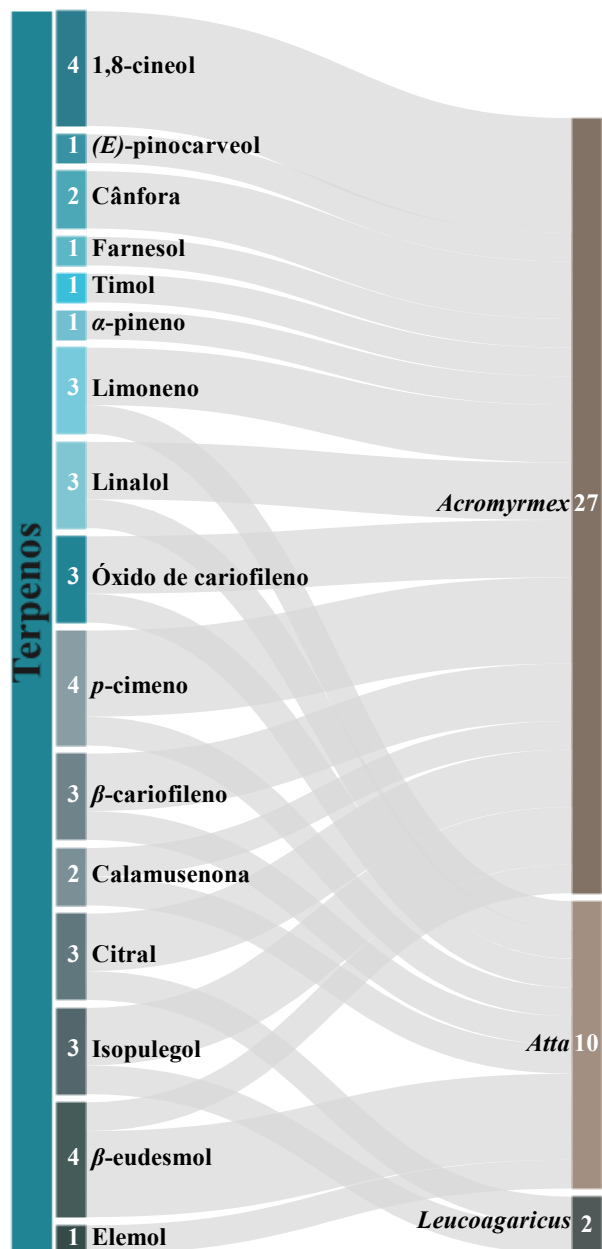


Figura 6 - Distribuição dos principais compostos da classe dos terpenos e suas associações com os organismos-alvo (i.e. *Atta*, *Acromyrmex* e *Leucoagaricus gongylophorus*) nos estudos incluídos na revisão sistemática. A espessura das barras e das linhas de conexão é proporcional ao número de estudos que avaliaram cada composto terpênico contra os respectivos organismos-alvo. Foram incluídos 48 estudos na revisão sistemática, sendo representadas na figura 25 associações. Um mesmo estudo pode avaliar mais de um terpeno e/ou organismo-alvo.

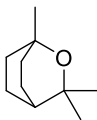
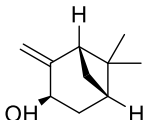
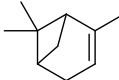
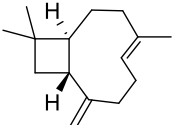
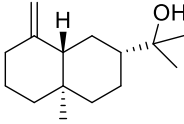
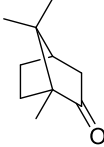
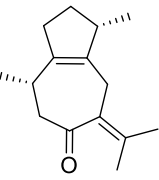
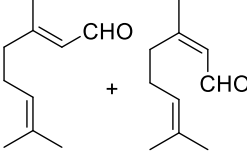
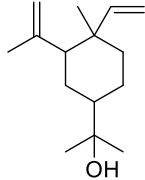
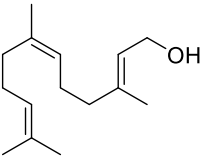
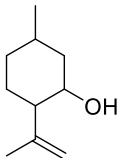
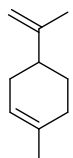
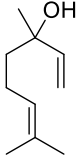
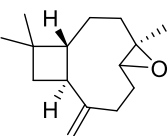
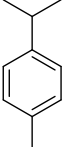
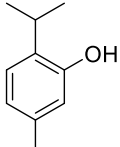
 1. 1,8-cineol Fórmula: C₁₀H₁₈O	 2. (E)-pinocarveol Fórmula: C₁₀H₁₆O	 3. α-pineno Fórmula: C₁₀H₁₆	 4. β-cariofileno Fórmula: C₁₅H₂₄
 5. β-eudesmol Fórmula: C₁₅H₂₆O	 6. Cânfora Fórmula: C₁₀H₁₆O	 7. Calamusenona Fórmula: C₁₅H₂₂O	 8. Citral Fórmula: C₁₀H₁₆O
 9. Elemol Fórmula: C₁₅H₂₆O	 10. Farnesol Fórmula: C₁₅H₂₆O	 11. Isopulegol Fórmula: C₁₀H₁₈O	 12. Limoneno Fórmula: C₁₀H₁₆
 13. Linalol Fórmula: C₁₀H₁₈O	 14. Óxido de cariofileno Fórmula: C₁₅H₂₄O	 15. p-cimeno Fórmula: C₁₀H₁₄	 16. Timol Fórmula: C₁₀H₁₄O

Figura 7 - Estruturas químicas dos principais compostos isolados pertencentes à classe dos terpenos identificados nos estudos incluídos na revisão sistemática, sobre fitoquímicos avaliados contra formigas-cortadeiras (*Atta* spp. e *Acromyrmex* spp.) e o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

Entre os terpenos selecionados por apresentarem resultados de maior destaque, foram observados diferentes efeitos sobre as formigas-cortadeiras, incluindo alterações comportamentais, como agressividade, mutilação, repelência, irritabilidade, desorientação e alterações locomotoras, além de atividade inseticida. O citral destacou-se por apresentar efeitos sobre ambos os componentes do sistema formiga–fungo, com atividade inseticida sobre *Acromyrmex balzani* e atividade fungicida e inibição do crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus* (Tabela 1).

Tabela 1 - Terpenos selecionados por apresentarem resultados de maior relevância quanto aos efeitos subletais, letais e antifúngicos sobre formigas-cortadeiras e seu fungo simbionte.

Composto	Organismo-alvo	Comportamento/efeito subletal	Mortalidade / efeito letal	Efeito sobre o fungo	Referência
β-eudesmol	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Agressividade e mutilação	Atividade inseticida	—	Marsaro et al. (2004); Marinho et al. (2005, 2006)
<i>p</i>-cimeno	<i>Atta sexdens</i> / <i>Acromyrmex balzani</i>	Repelência e irritabilidade	Atividade inseticida	—	De Oliveira et al. (2017)
Limoneno	<i>Atta sexdens</i> / <i>Acromyrmex balzani</i>	Repelência e irritabilidade	Atividade inseticida	—	De Oliveira et al. (2017)
Linalol	<i>Atta sexdens</i> / <i>Acromyrmex balzani</i>	Repelência e irritabilidade	Atividade inseticida	—	De Oliveira et al. (2017)
1,8-cineol	<i>Acromyrmex balzani</i>	Alterações locomotoras	Atividade inseticida	—	Silva et al. (2019)
Cânfora	<i>Acromyrmex balzani</i>	Repelência e alterações locomotoras	Atividade inseticida	—	Silva et al. (2019); Brito et al. (2020)
Isopulegol	<i>Acromyrmex balzani</i>	Alterações locomotoras	Atividade inseticida	—	Melo et al. (2021)
Timol	<i>Acromyrmex balzani</i>	Redução da velocidade e distância de caminhada; desorientação	Atividade inseticida	—	Dantas et al. (2023)
Citral	<i>Acromyrmex balzani</i> / <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Alterações no comportamento de caminhada	Atividade inseticida	Atividade fungicida e inibição do crescimento micelial	Melo et al. (2020, 2021)

3.7 Abordagens experimentais empregadas nos estudos

Os estudos incluídos na revisão sistemática apresentaram diferentes abordagens experimentais quanto aos organismos-alvo, às unidades experimentais, ao tipo de fitoquímico avaliado, ao sistema experimental e à via de aplicação. As investigações foram conduzidas

predominantemente com operárias de *Atta* e *Acromyrmex*, embora também tenham sido identificados estudos com rainhas, colônias e o fungo simbionte *L. gongylophorus*. Em relação aos fitoquímicos, foram avaliados extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados, principalmente em condições de laboratório, utilizando diferentes vias de aplicação, incluindo contato, ingestão, fumigação e incorporação ao meio de cultura. A distribuição das abordagens experimentais empregadas nos estudos é apresentada na **figura 8**.

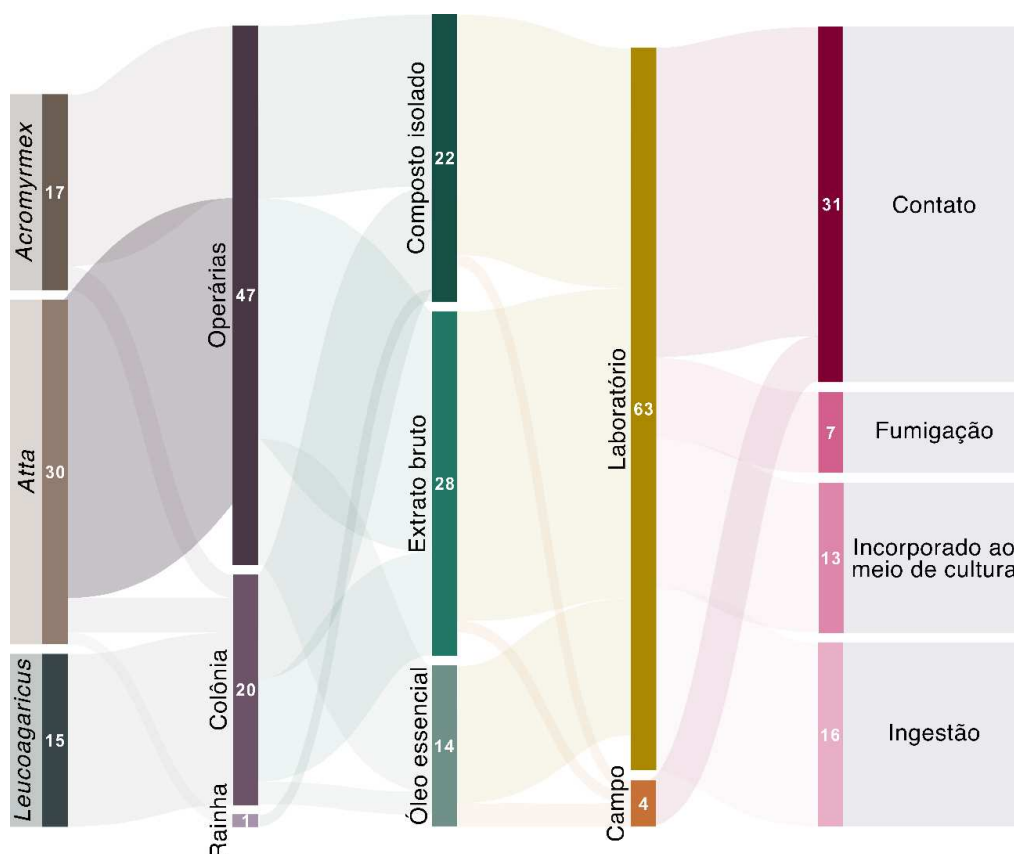


Figura 8 - Diagrama de relações entre organismos-alvo (i.e. *Atta*, *Acromyrmex* e *Leucoagaricus gongylophorus*), unidades experimentais, tipos de fitoquímicos, sistemas experimentais e vias de aplicação avaliados na revisão sistemática. A espessura das barras e das linhas de conexão é proporcional ao número de estudos que empregaram cada combinação metodológica. Foram incluídos 48 estudos na revisão sistemática, sendo representadas na figura 24 associações metodológicas. Um mesmo estudo pode contribuir com mais de uma unidade experimental, sistema experimental e/ou via de aplicação.

3.8 Síntese quantitativa das evidências

3.8.1 Relato de DL_{50} e CL_{50}

Entre os estudos que avaliaram parâmetros toxicológicos, o método de contato foi o mais frequente (31 estudos), seguido pela ingestão (16) e fumigação (7). Entretanto, a disponibilidade de estimativas de CL_{50} e DL_{50} foi limitada. Para CL_{50} , o parâmetro foi reportado em seis dos sete estudos conduzidos por fumigação, em um dos 16 por ingestão e em um dos 31 por contato. Para DL_{50} , nenhum dos estudos conduzidos por fumigação apresentou esse

parâmetro, enquanto sua presença foi registrada em um estudo por ingestão e em um por contato.

Na síntese quantitativa, a frequência de relato de CL_{50} em relação à DL_{50} variou entre os métodos de aplicação, com estimativa combinada de $RR = 0,12$ (IC95%: 0,02–0,60) e elevada heterogeneidade entre os métodos ($I^2 = 76,9\%$), sem diferença significativa entre os subgrupos ($P = 0,39$) (**Figura 9**).

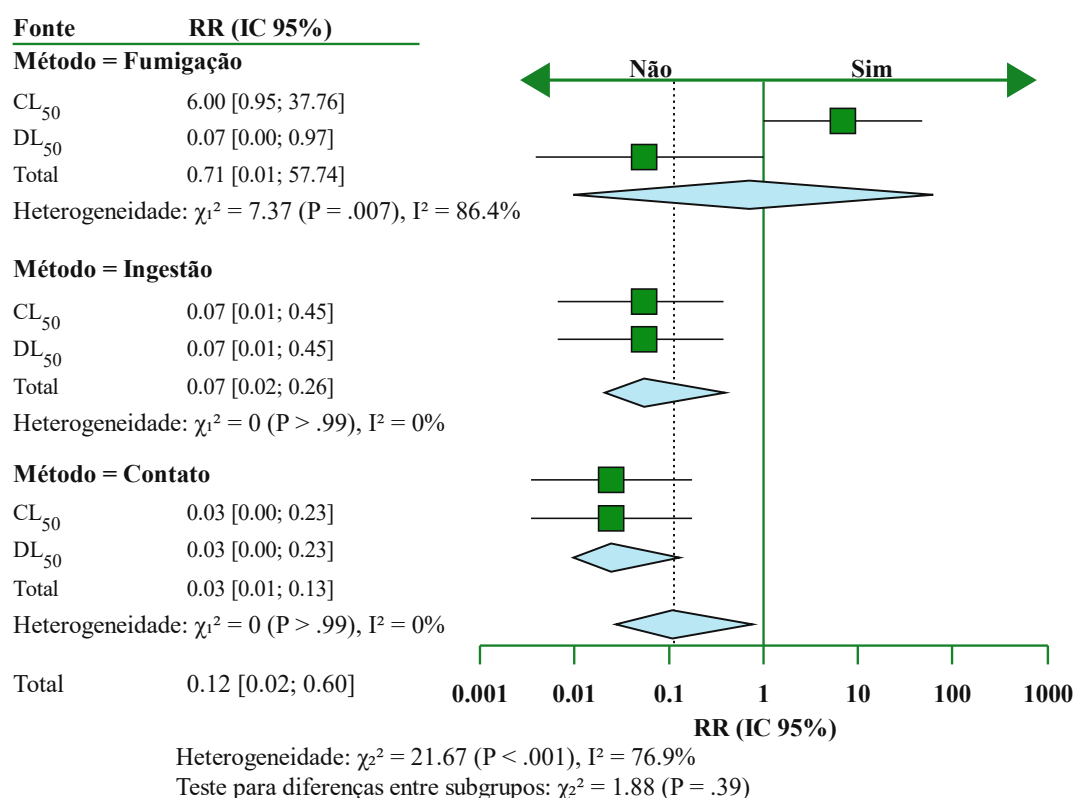


Figura 9 - Frequência de estudos que avaliaram ou relataram a concentração letal mediana (CL_{50}) e a dose letal mediana (DL_{50}), de acordo com a via de aplicação dos fitoquímicos. “Sim” indica que o parâmetro foi avaliado ou relatado no estudo, enquanto “Não” indica sua ausência. Foram consideradas as vias de fumigação, ingestão e contato. As estimativas apresentadas representam a frequência relativa de avaliação ou relato desses parâmetros, não uma comparação direta da toxicidade dos fitoquímicos entre as vias de exposição.

3.8.2 Efeitos subletais

A síntese quantitativa da frequência de avaliação ou relato de efeitos subletais de fitoquímicos de origem vegetal sobre formigas-cortadeiras não indicou diferença significativa na análise global ($RR = 1,97$; IC95%: 0,19–20,22), com elevada heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 90,7\%$). Na análise por gênero, a frequência de avaliação ou relato de efeitos subletais foi maior nos estudos com *Acromyrmex* ($RR = 7,00$; IC95%: 1,89–25,93), enquanto os estudos envolvendo *Atta* não apresentaram diferença significativa ($RR = 0,65$; IC95%: 0,37–1,12). A diferença entre os subgrupos foi significativa ($P = 0,001$) (**Figura 10**).

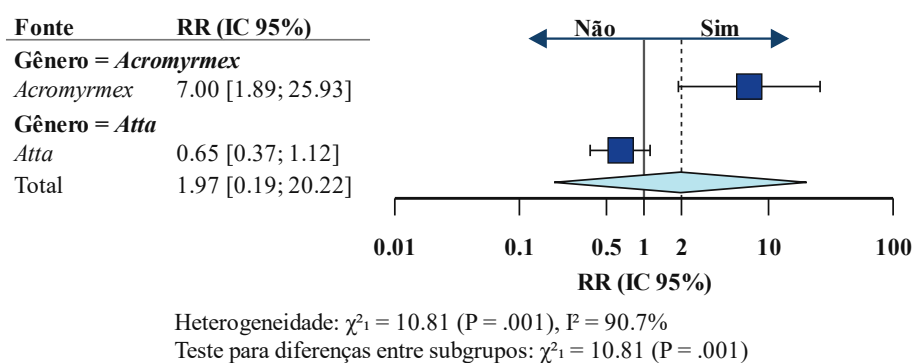


Figura 10 - Forest plot da meta-análise da frequência de estudos que avaliaram efeitos subletais de fitoquímicos de origem vegetal sobre formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Os quadrados representam as estimativas de razão de riscos (RR) para cada grupo, com área proporcional ao peso relativo da respectiva estimativa, e as barras horizontais indicam os intervalos de confiança de 95% (IC95%). O losango representa a estimativa combinada. As estimativas refletem a frequência relativa de estudos que avaliaram efeitos subletais e não a magnitude biológica direta desses efeitos.

A síntese quantitativa da frequência de avaliação ou relato de efeitos subletais de compostos pertencentes à classe dos terpenos sobre formigas-cortadeiras indicou maior frequência desses desfechos nos estudos com *Acromyrmex* (RR = 4,00; IC95%: 1,11–14,35), enquanto os estudos conduzidos com *Atta* apresentaram RR = 5,00 (IC95%: 0,81–31,00). Apesar das estimativas observadas, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os gêneros ($P = 0,84$), conforme apresentado na **figura 11**.

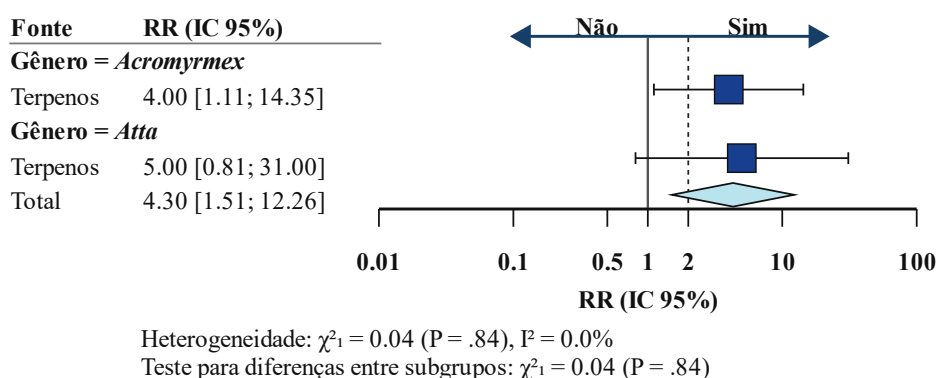


Figura 11 - Forest plot da meta-análise da frequência de estudos que avaliaram efeitos subletais de terpenos sobre formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Os quadrados representam as estimativas de razão de riscos (RR) para cada grupo, com área proporcional ao peso relativo da respectiva estimativa, e as barras horizontais indicam os intervalos de confiança de 95% (IC95%). O losango representa a estimativa combinada. As estimativas refletem a frequência relativa de estudos que avaliaram efeitos subletais e não a magnitude biológica direta desses efeitos.

4. DISCUSSÃO

Os resultados desta revisão sistemática e meta-análise sustentam parcialmente as hipóteses propostas. A produção científica sobre fitoquímicos aplicados ao manejo de formigas-

cortadeiras cresceu ao longo do tempo; contudo, as evidências permanecem heterogêneas quanto aos organismos-alvo, produtos avaliados, abordagens experimentais e desfechos considerados. Embora os estudos disponíveis indiquem atividade inseticida e fungicida de diferentes fitoquímicos, expressa por efeitos letais e subletais sobre as formigas e por inibição do crescimento ou da biomassa do fungo simbionte, persistem lacunas metodológicas e diferenças nas abordagens experimentais de investigação que limitam a comparação entre resultados e a transposição para o manejo em condições operacionais.

4.1 Evolução e distribuição das evidências

O crescimento da produção científica observado nesta revisão acompanha a expansão do interesse por inseticidas de origem vegetal. Turchen et al. (2020) identificaram um crescimento exponencial das pesquisas com inseticidas botânicos a partir da década de 1990, enquanto Collares et al. (2023) destacaram a crescente atenção aos fitoquímicos como potenciais agentes de controle de insetos. De modo compatível, os estudos sobre formigas-cortadeiras tornaram-se mais frequentes a partir de 2010, possivelmente em resposta tanto à busca por alternativas aos inseticidas convencionais quanto à maior disponibilidade de ferramentas analíticas para investigar matrizes vegetais complexas. O desenvolvimento de técnicas cromatográficas mais sofisticadas, contribuíram para ampliar a capacidade de separação, identificação e caracterização de compostos presentes em matrizes vegetais, favorecendo a investigação de metabólitos associados à atividade inseticida (Scott, 2020).

Quanto à distribuição geográfica, os estudos revelaram forte concentração das evidências no Brasil, enquanto países como Argentina, Colômbia, Estados Unidos, Guadalupe (França) e México apresentaram participação mais limitada. Esse predomínio pode estar relacionado tanto à distribuição neotropical das formigas-cortadeiras e à sua relevância econômica nos sistemas agrícolas e florestais da América Latina quanto à maior concentração de pesquisadores que atuam nessa área no Brasil (Della Lucia et al. 2014; Melo et al., 2020; Lemes et al., 2017). Além disso, a elevada diversidade de espécies vegetais na região neotropical em geral, e o Brasil em particular, amplia o interesse e as possibilidades de identificação de compostos bioativos com potencial inseticida na região (Collares et al., 2023; Magalhães, 2025).

O padrão observado é consistente com revisões recentes sobre o uso de produtos botânicos no manejo de formigas-cortadeiras, que destacam a participação expressiva do Brasil em estudos envolvendo óleos essenciais e controle de formigas-cortadeiras, sobretudo com saúva-limão *Atta sexdens* (Pinheiro et al., 2025; Magalhães, 2025). Ainda assim, a concentração

geográfica das evidências sugere que a diversidade de plantas e de espécies de formigas explorada permanece aquém do potencial existente na própria região neotropical.

4.2 Diversidade botânica e química

A distribuição das evidências entre as famílias botânicas não foi homogênea. Embora tenham sido identificadas 59 famílias como fontes de fitoquímicos na presente revisão, os estudos concentraram-se principalmente em Myrtaceae, Euphorbiaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Apocynaceae, Meliaceae e Asteraceae. Esse padrão converge com diferentes abordagens da literatura sobre produtos de origem vegetal. Turchen et al. (2020) identificaram aproximadamente 190 famílias investigadas em estudos sobre inseticidas botânicos, com maior concentração em Meliaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rutaceae e Fabaceae, enquanto Collares et al. (2023) encontraram 34 famílias em estudos com fitoquímicos, com predominância de Lamiaceae, Asteraceae e Rubiaceae.

Especificamente para óleos essenciais contra formigas-cortadeiras, Pinheiro et al. (2025) identificaram sete famílias, com destaque para Myrtaceae, Euphorbiaceae e Lamiaceae. Apesar das diferenças de escopo entre os levantamentos, a recorrência de *Myrtaceae*, *Lamiaceae* e *Asteraceae* sugere maior interesse investigativo nessas famílias como fontes de compostos bioativos. Essa frequência, entretanto, não implica maior atividade biológica, pois pode refletir fatores como disponibilidade das plantas, tradição de uso, facilidade de obtenção e interesse químico prévio.

Os estudos abrangeram diferentes níveis de caracterização dos produtos, incluindo extratos brutos, óleos essenciais e compostos isolados. Enquanto os compostos isolados permitem avaliar mais diretamente a contribuição de moléculas específicas (De Oliveira et al., 2017), extratos e óleos essenciais apresentam múltiplos constituintes, sujeitos a interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas (Ramos et al., 2019; Mendonça et al., 2024; Bakkali et al., 2008; Nerio et al., 2010). Em formigas-cortadeiras, a maior toxicidade de óleos essenciais em relação a alguns constituintes isolados reforça que a atividade biológica não depende necessariamente do composto majoritário (Feitosa-Alcantara et al., 2017). Em conjunto, esses aspectos evidenciam a importância da caracterização química das preparações vegetais para interpretar a atividade biológica e identificar os compostos potencialmente responsáveis pelos efeitos observados.

4.3 Compostos bioativos

Considerando os compostos bioativos das pesquisas realizadas foi identificado que os terpenos foram a classe química mais frequentemente investigada nos estudos incluídos, com 1,8-cineol, limoneno, linalol, citral, óxido de cariofileno e β -eudesmol entre os compostos mais recorrentes. A predominância dessa classe é consistente com a reconhecida importância dos terpenos como metabólitos secundários associados à defesa vegetal e à atividade biológica, incluindo efeitos inseticidas e fungicidas (Ninkuu et al., 2021; Collares et al., 2023). Entre os terpenos, compostos como limoneno, linalol, α -pineno e timol estão entre os mais investigados e apresentam atividade biológica contra diferentes insetos, incluindo formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Pinheiro et al., 2025).

Em formigas-cortadeiras, essa relevância também pode estar relacionada à própria defesa química das plantas, uma vez que terpenos e outros metabólitos secundários podem contribuir para a resistência de determinadas espécies vegetais ao ataque dessas formigas (Marsaro Jr. et al., 2004). Entretanto, a recorrência de uma classe química na literatura não equivale, por si só, à demonstração de superioridade para o manejo. A eficácia prática dependerá da concentração, da formulação, da via de exposição, da casta exposta, da espécie de formiga e, sobretudo, da capacidade do composto alcançar os componentes vulneráveis da colônia. Assim, avaliação de um determinado produto (composto, substância ou óleo essencial) torna a pesquisa complexa ao apresentar diversas variáveis envolvidas.

Embora a mortalidade seja um dos principais parâmetros empregados na avaliação da atividade inseticida, os estudos analisados evidenciam que alguns terpenos apresentam múltiplos efeitos sobre as formigas, combinando toxicidade com alterações comportamentais. O β -eudesmol constitui um dos exemplos mais expressivos: em saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa*, foi associado à indução de agressividade, mutilação e mortalidade, com respostas relacionadas à concentração (Marsaro Jr. et al., 2004; Marinho et al., 2005). Estudos posteriores envolvendo diferentes espécies de *Atta* e *Acromyrmex* mostraram que a resposta comportamental foi mais evidente nas espécies de *Atta*, particularmente em *A. sexdens rubropilosa*, indicando que a resposta ao composto pode variar entre táxons (Marinho et al., 2006).

Outros terpenos também apresentaram sobreposição de efeitos. O 1,8-cineol, o timol, o p-cimeno, o limoneno e o linalol foram associados a respostas tóxicas e/ou comportamentais nos estudos avaliados, enquanto o citral se destacou por apresentar atividade sobre as formigas *Acromyrmex balzani* e sobre o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (Dantas et al.,

2023; Melo et al., 2020; Pinheiro et al., 2025). Esses resultados sugerem que a avaliação de fitoquímicos não deve se restringir à mortalidade de operárias expostas, pois mudanças comportamentais podem preceder ou acompanhar efeitos letais e modificar o desempenho coletivo da colônia. Neste caso, a fixação de um protocolo de avaliação de substâncias em colônias de formigas-cortadeiras torna-se crucial no avanço das pesquisas.

Alterações na locomoção, alimentação, forrageamento, comunicação, agressividade e interação entre indivíduos podem comprometer o desempenho das operárias e, consequentemente, atividades essenciais à manutenção da colônia (Lee, 2000; Müller, 2018; Dantas et al., 2023). Essa característica assume importância ainda maior em insetos eussociais, nos quais a organização da colônia depende da cooperação e da divisão de trabalho entre indivíduos. Sob essa perspectiva, a colônia deve ser entendida como um superorganismo, no qual o efeito sobre uma casta ou uma tarefa pode repercutir além do indivíduo diretamente exposto (Hölldobler; Wilson, 2009; Della Lucia et al., 2014; Li et al., 2020).

A organização das formigas-cortadeiras envolve forrageamento coletivo, transferência de informações, divisão de tarefas, práticas de higiene e manutenção contínua do fungo cultivado (Hölldobler; Wilson, 2009; Della Lucia et al., 2014). Compostos que alteram o comportamento das operárias podem, assim, interferir em processos indispensáveis à colônia. O β -eudesmol, por exemplo, associa alterações comportamentais e mortalidade, enquanto o timol apresenta efeitos sobre a sobrevivência e o comportamento de *Acromyrmex balzani* (Dantas et al., 2023). O citral, por sua vez, amplia essa perspectiva ao atuar tanto sobre as formigas quanto sobre o fungo simbiote (Dantas et al., 2023; Melo et al., 2020). A combinação de efeitos sobre operárias, fungo e dinâmica da colônia merece, portanto, atenção maior do que a usualmente dispensada a um único desfecho laboratorial.

4.4 Tendências metodológicas

A literatura disponível acerca do tema mostra que poucos estudos realizaram testes toxicológicos padronizados e, quando o fizeram, raramente compararam castas diferentes ou avançaram além de parâmetros de mortalidade, como DL_{50} e CL_{50} . Tais parâmetros são informativos, mas descrevem principalmente efeitos letais sobre indivíduos expostos. Em condições de campo, contudo, exposições subletais são frequentes e seus efeitos podem comprometer funções críticas sem causar mortalidade imediata (Guedes et al., 2016, 2026a).

Essa limitação torna-se mais importante no caso de insetos sociais, pois o alvo de controle não é uma operária isolada, mas a colônia, entendida como um superorganismo (Della

Lucia et al., 2014; Gandra et al., 2016, 2024). O funcionamento das iscas formicidas ilustra bem essa particularidade. Em aplicações de larga escala, especialmente em maciços florestais, as forrageadoras precisam localizar, aceitar, transportar e distribuir a isca antes que o ingrediente ativo atinja componentes suscetíveis da colônia, como jardineiras, jardim fúngico e/ou rainha (Della Lucia et al., 2014; Gandra et al., 2016; Cruz et al., 2026).

Uma mortalidade rápida ou um efeito comportamental intenso sobre as forrageadoras pode, paradoxalmente, reduzir o desempenho da isca, ao impedir que ela alcance esses alvos no interior da colônia (Gandra et al. 2016; Cruz et al. 2026). Por isso, a toxicidade diferencial entre castas, particularmente entre forrageadoras e jardineiras, bem como a avaliação de efeitos subletais que não impeçam o carregamento e a distribuição do produto, são aspectos centrais para o desenvolvimento de uma isca efetiva (Della Lucia et al. 2014).

Nesse contexto, a elevada pressão de vapor e a ação fumigante tendem a ter relevância limitada para a lógica operacional das iscas formicidas. O mesmo vale, em grande medida, para a ingestão direta do substrato vegetal forrageado, pois ele é utilizado predominantemente no cultivo do fungo simbiote. As operárias também podem obter nutrientes diretamente da seiva vegetal, enquanto as estruturas produzidas pelo fungo constituem importante fonte alimentar (Della Lucia et al. 2014). Ainda assim, cerca de 40% dos trabalhos catalogados concentraram-se em ação fumigante ou ingestão, enquanto a toxicidade por contato comparada entre castas, informação mais diretamente vinculada ao transporte e à distribuição de iscas, permaneceu pouco explorada (Graebin et al., 2024, 2026; Cruz et al., 2026).

As investigações sobre efeitos subletais e avaliações em nível de colônia também foram pouco frequentes. Nas meta-análises baseadas na frequência de estudos que avaliaram esses efeitos, houve maior frequência de estudos sobre efeitos subletais em *Acromyrmex* do que em *Atta*; entretanto, a elevada heterogeneidade recomenda cautela na interpretação desse contraste. Quando considerados apenas os terpenos, classe com maior disponibilidade de estudos, os efeitos subletais foram significativos e os resultados não diferiram entre os dois gêneros de formigas-cortadeiras. Essas estimativas refletem padrões de relato e avaliação na literatura, e não a magnitude comparativa dos efeitos biológicos entre gêneros ou classes químicas.

Os estudos com o fungo simbiote também foram escassos, apesar de sua importância direta e indireta para a persistência da colônia (Della Lucia et al., 2014; Gandra et al., 2016; Cruz et al., 2026). Um efeito fungicida pode comprometer o jardim fúngico, inviabilizar a manutenção da colônia e contribuir para sua supressão (Della Lucia et al., 2014). Apesar disso,

apenas um dos estudos catalogados estimou a concentração inibitória mediana (IC_{50}) para o fungo simbiote, indicando que essa dimensão permanece pouco investigada.

O fungo também pode ser comprometido indiretamente quando fitoquímicos afetam as jardineiras, responsáveis por sua manutenção. Mortalidade elevada nessa casta ou perturbações de suas funções podem reduzir o cuidado com o jardim fúngico e, conseqüentemente, o suprimento alimentar da colônia, contribuindo para seu colapso. Os principais inseticidas e os mais efetivos empregados em iscas formicidas apresentam esse padrão de supressão de colônia (Gandra et al., 2016; Cruz et al., 2026). Ainda assim, a interação entre toxicidade para jardineiras, manutenção do fungo e desempenho da colônia raramente tem sido incorporada à investigação de fitoquímicos.

4.5 Lacunas e perspectivas

Os estudos sobre a ação inseticida de fitoquímicos em formigas-cortadeiras vêm aumentando, em parte devido à necessidade de alternativas aos inseticidas organossintéticos atualmente empregados no manejo, como fipronil e sulfluramida. Esses ingredientes ativos enfrentam restrições em sistemas submetidos à certificação florestal e, em alguns contextos, dependem de autorizações excepcionais de uso, o que aumenta o interesse por novas opções de controle. A concentração das pesquisas na região neotropical parece decorrer tanto da distribuição das formigas-cortadeiras quanto de sua importância econômica, especialmente em sistemas agrícolas e nos extensos plantios florestais brasileiros.

Apesar das iscas formicidas constituírem a principal tática de controle em áreas extensas, uma parcela considerável do esforço de pesquisa concentrou-se em métodos e atributos pouco conectados à dinâmica de uma isca e ao funcionamento da colônia. Estudos que comparem a resposta de castas distintas por contato, avaliem simultaneamente efeitos letais e subletais, examinem o fungo simbiote e acompanhem a trajetória do efeito em nível de colônia ainda são incomuns. Essa lacuna parece decisiva, pois uma molécula promissora em bioensaios individuais pode falhar se a coleta ou o transporte da isca for reduzido antes de alcançar seus alvos internos.

Os terpenos, classe de fitoquímicos mais estudada, ainda reproduzem limitações gerais observadas na literatura. O predomínio de estudos com misturas complexas, extratos e óleos essenciais também reduz a capacidade de identificar os compostos mais promissores e de explorar, de modo racional, formulações, doses, combinações ou modificações estruturais voltadas ao uso pretendido. Extratos e óleos podem conservar interações biologicamente

relevantes entre seus constituintes, mas estudos com moléculas isoladas e combinações definidas são necessários para distinguir sinergismos reais de efeitos atribuídos apenas a compostos majoritários.

O caminho para o uso sustentável de fitoquímicos contra formigas-cortadeiras não passa, simplesmente, pela substituição de um ingrediente ativo por outro. Exige reconhecer que o alvo é uma colônia organizada em castas, sustentada por um fungo cultivado e dependente de uma rede contínua de forrageamento, cuidado e comunicação. Fitoquímicos realmente promissores serão aqueles capazes de interagir com essa organização sem interromper prematuramente o transporte da isca e de comprometer, de forma seletiva e mensurável, os componentes que sustentam a colônia.

5. CONCLUSÃO

A revisão sistemática mostrou que fitoquímicos de origem vegetal podem produzir efeitos letais e subletais sobre formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, além de inibir o crescimento ou reduzir a biomassa do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Entretanto, os 48 estudos incluídos apresentaram elevada heterogeneidade quanto aos produtos avaliados, organismos-alvo, vias de exposição e desfechos experimentais. Predominaram ensaios laboratoriais realizados com operárias isoladas, enquanto estudos envolvendo diferentes castas, o fungo simbiote e a resposta integrada da colônia foram pouco frequentes. A baixa disponibilidade de estimativas de DL_{50} , CL_{50} e IC_{50} também limitou a comparação quantitativa entre os fitoquímicos. Assim, embora a literatura demonstre atividade biológica de diferentes produtos vegetais, as evidências disponíveis ainda são insuficientes para confirmar sua eficácia em condições operacionais de manejo. O avanço nessa área requer protocolos padronizados e estudos que integrem efeitos letais e subletais, respostas de diferentes castas, transporte e distribuição de iscas, atividade sobre o fungo cultivado e desfechos em nível de colônia.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, K. D.; MARTÍNEZ, L. C.; LIMA, M. A. P.; SERRÃO, J. E.; DELLA LUCIA, T. M. C. Azadirachtin impairs egg production in *Atta sexdens* leaf-cutting ant queens. *Environmental Pollution*, v. 243, p. 809–814, 2018.
- ARAÚJO, S.; SEIBERT, J.; RUANI, A.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; CRUZ, A.; PEREIRA, A.; [demais autores]. The symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae) as a target organism to control leaf-cutting ants. *Insects*, v. 13, p. 359, 2022.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

BOULOGNE, I.; DESFONTAINES, L.; OZIER-LAFONTAINE, H.; LORANGER-MERCIRIS, G. Sustainable management of *Acromyrmex octospinosus* (Reich): how botanical extracts should promote an ecofriendly control strategy. *Sociobiology*, v. 65, n. 3, p. 357–348, 2018.

BOULOGNE, I.; OZIER-LAFONTAINE, H.; GERMOSÉN-ROBINEAU, L.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) management: effects of TRAMIL's fungicidal plant extracts. *Journal of Economic Entomology*, v. 105, n. 4, p. 1224–1233, 2012.

BRITO, F. A. L.; SANTANA, A. S.; SILVA, J. E.; NIZIO, D. A. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MELO, C. R.; MELO, J. O.; BLANK, A. F. Toxicity and behavioral alterations caused by essential oils of *Croton tetradenius* and their major compounds on *Acromyrmex balzani*. *Crop Protection*, v. 137, 105259, 2020.

BRITTO, J. S.; FORTI, L. C.; DE OLIVEIRA, M. A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; DA SILVA CAMARGO, R. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants, *Atta* and *Acromyrmex*. *International Journal of Research in Environmental Studies*, v. 3, p. 11–92, 2016.

COLLARES, L. J.; TURCHEN, L. M.; GUEDES, R. N. C. Research trends, biases, and gaps in phytochemicals as insecticides: literature survey and meta-analysis. *Plants*, v. 12, n. 2, p. 318, 2023.

CRUZ, L. S.; AMARAL, K. D.; LIRA, D. C.; BERNARDES, R. C.; TURCHEN, L. M.; GRAEBIN, A.; FERREIRA, H.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Mode of colony suppression of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) by an isocycloseram-based bait: caste mortality, behavior, and fungus garden collapse. *Journal of Economic Entomology*, 2026. In press. DOI: 10.1093/jee/toag262.

DANTAS, J. O.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARAÚJO, A. P. A.; SILVA, J. E.; BRITO, T. B.; ANDRADE, V. S.; PINHEIRO, H. S. S.; TAVARES, S. R. S. A.; BLANK, A. F.; BACCI, L. Formicidal potential of thymol derivatives: adverse effects on the survival and behavior of *Acromyrmex balzani*. *Agriculture*, v. 13, n. 7, p. 1410, 2023.

DE OLIVEIRA, B. M. S.; MELO, C. R.; ALVES, P. B.; SANTOS, A. A.; SANTOS, A. C. C.; SANTANA, A. S.; ARAÚJO, A. P. A.; NASCIMENTO, P. E. S.; BLANK, A. F.; BACCI, L. Essential oil of *Aristolochia trilobata*: synthesis, routes of exposure, acute toxicity, binary mixtures and behavioral effects on leaf-cutting ants. *Molecules*, v. 22, n. 3, p. 335, 2017. DOI: 10.3390/molecules22030335.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.

DIAZ NAPAL, G. N.; BUFFA, L. M.; NOLLI, L. C.; DEFAGÓ, M. T.; VALLADARES, G. R.; CARPINELLA, M. C.; RUIZ, G.; PALACIOS, S. M. Screening of native plants from central Argentina against the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii* and its symbiotic fungus. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 275–280, 2015.

DUTRA, J. C. F.; PASSOS, M. F.; GARCÍA, G. J. Y.; GOMES, R. F.; MAGALHÃES, T. A.; FREITAS, A. S.; LAGUNA, J. G.; COSTA, F. M. R.; SILVA, T. F.; RODRIGUES, L. S.; AMÉRICO, M. F.; CAMPOS, G. M.; PEREIRA, G.; VANDENBERGHE, L.; SOCCOL, C. R.; GÓES-NETO, A.; AZEVEDO, V. A. C. Anaerobic digestion using cocoa residues as substrate: Systematic review and meta-analysis. *Energy for Sustainable Development*, v. 72, p. 265–277, 2023.

FEITOSA-ALCANTARA, R. B.; BACCI, L.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; SILVA, I. M. A.; SOARES, C. A.; SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Essential oils of *Hyptis pectinata* chemotypes: isolation, binary mixtures and acute toxicity on leaf-cutting ants. *Molecules*, v. 22, n. 4, p. 621, 2017.

GANDRA, L. C.; AMARAL, K. D.; COUCEIRO, J. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Management Science*, v. 72, p. 1475–1481, 2016.

GANDRA, L. C.; TURCHEN, L. M.; AMARAL, K. D.; GUEDES, R. N. C.; DELLA LUCIA, T. M. C. Harmony under threat: does resource-mediated stress affect the (caste-based) social network of leaf-cutting ant colonies? *Pest Management Science*, v. 80, p. 6159–6166, 2024.

GRAEBIN, A.; AMARAL, K. D.; LIRA, D. C.; COLLARES, L. J.; BERNARDES, R. C.; TURCHEN, L. M.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Nasturtium leaf compounds, diphenyl disulfide and lylal, against *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungi. *Journal of Economic Entomology*, v. 117, p. 1703–1711, 2024.

GRAEBIN, A.; PINHEIRO, P. F.; AMARAL, K. D.; SANTOS, V. F.; NASCIMENTO, T. F.; VILELA, M. V. S.; SILVA, Y. K. M.; MARCELINO, T. D.; GUEDES, R. N. C. Selectively targeting of gardeners and symbiotic fungus in leaf-cutting ant colonies using essential oils. *Insects*, v. 17, p. 645, 2026.

GODOY, M. F. P.; VICTOR, S. R.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JUNIOR, 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 the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 3B, p. 669–672, 2005.

GUEDES, R. N. C.; SAMGGHE, G.; STARK, J. D.; DESNEUX, N. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, v. 61, p. 43–62, 2016.

GUEDES, R. N. C.; BERENBAUM, M. R.; BIONDI, A.; DESNEUX, N. The side effects of pesticides on nontarget arthropods. *Annual Review of Entomology*, v. 71, p. 381–403, 2026a.

GUEDES, R. N. C.; TAVELLA, L.; ZAPPALÀ, L.; TURCHEN, L. M. Beyond the usual targets: pesticide and biopesticide interactions with natural enemies in ecological networks. *Current Opinion in Insect Science*, v. 74, 101483, 2026b.

HADDI, K.; TURCHEN, L. M.; VITERI JUMBO, L. O.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G.; AGUIAR, R. W. S.; OLIVEIRA, E. E. Rethinking biorational insecticides for pest management: unintended effects and consequences. *Pest Management Science*, v. 76, n. 7, p. 2286–2293, 2020. DOI: 10.1002/ps.5837.

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

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. *The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. New York: W. W. Norton and Company, 2009.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 41–66, 2008.

INFANTE-RODRÍGUEZ, D. A.; MONRIBOT-VILLANUEVA, J. L.; MEHLTRETER, K.; CARRIÓN, G. L.; LACHAUD, J. P.; VELÁZQUEZ-NARVÁEZ, A. C.; VÁSQUEZ-REYES, V. M.; VALENZUELA-GONZÁLEZ, J. E.; GUERRERO-ANALCO, J. A. Phytochemical characteristics of leaves determine foraging rate of the leaf-cutting ant *Atta mexicana* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology*, v. 30, p. 147–159, 2020. DOI: 10.1007/s00049-020-00306-4.

INFANTE-RODRÍGUEZ, D. A.; MONRIBOT-VILLANUEVA, J. L.; MEHLTRETER, K.; CARRIÓN, G. L.; LACHAUD, J. P.; VELÁZQUEZ-NARVÁEZ, A. C.; VÁSQUEZ-REYES, V. M.; VALENZUELA-GONZÁLEZ, J. E.; GUERRERO-ANALCO, J. A. *Insect-plant interaction*. New York: Springer-Verlag, 1990.

LABANDEIRA, C. C.; TREMBLAY, S. L.; BARTOWSKI, K. E.; VANALLER HERNICK, L. V. Middle Devonian liverwort herbivory and antiherbivore defence. *New Phytologist*, v. 202, p. 247–258, 2014.

LEE, C. Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review. *Journal of Biosciences*, v. 11, p. 107–112, 2000.

LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E.; LAWSON, S. A. Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy and integrated pest management in certified tropical plantations. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 1283–1295, 2017.

LI, H.; SUN, C.-Y.; FANG, Y.; CARLSON, C. M.; XU, H.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; ZARNOWSKI, R.; BECHTEL, H. A.; FOURNELLE, J. H.; ANDES, D. R.; SCHULTZ, T. R.; GILBERT, P. U. P. A.; CURRIE, C. R. Biomineral armor in leaf-cutter ants. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 5792, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-19566-3.

LÓPEZ-CARRETERO, A.; DÍAZ-CASTELAZO, C.; BOEGE, K.; RICO-GRAY, V. Evaluating the spatio-temporal factors that structure network parameters of plant–herbivore interactions. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, e110430, 2014.

MAGALHÃES, M. Alternativas para controle de populações de *Atta sexdens*: uma revisão sobre a eficácia de inseticidas de produtos naturais botânicos. *Acta Biologica Brasiliensia*, v. 8, n. 2, p. 417–436, 2025. DOI: 10.18554/acbiobras.v8i2.8761.

MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C.; RIBEIRO, M. M. R.; LIMA, E. R. β -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 117, n. 1, p. 89–93, 2005.

MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Aggressive response of pest ant species to β -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 47, n. 2, p. 445–454, 2006.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; SOUZA, R. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 9, p. 1771–1780, 2004. DOI: 10.1023/B.0000042400.14451.08.

MELO, C. R.; OLIVEIRA, B. M. S.; SANTOS, A. C. C.; SILVA, J. E.; RIBEIRO, G. T.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; BACCI, L. Synergistic effect of aromatic plant essential oils on the ant *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) and antifungal activity on its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 14, p. 17303–17313, 2020. DOI: 10.1007/s11356-020-08170-z.

MENDONÇA, J. F.; DE SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; FERNANDES, C. C.; DOS SANTOS, A. C. V.; LOPES, L. M.; FERRAZ, M. S. S.; PRATES, L. H. F. Yield, composition and toxicity of piperaceae volatiles to pest insects. *Revista Caatinga*, v. 37, e12298, 2024. DOI: 10.1590/1983-21252024v3712298rc.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; PRISMA GROUP. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Medicine*, v. 6, n. 7, e1000097, 2009. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000097.

MÜLLER, C. Impacts of sublethal insecticide exposure on insects—Facts and knowledge gaps. *Basic and Applied Ecology*, v. 30, p. 1–10, 2018.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 372–378, 2010.

NINKUU, V.; ZHANG, L.; YAN, J.; FU, Z.; YANG, T.; ZENG, H. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 5710, 2021.

PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T. C.; MULROW, C. D.; SHAMSEER, L.; TETZLAFF, J. M.; AKL, E. A.; BRENNAN, S. E.;

CHOU, R.; GLANVILLE, J.; GRIMSHAW, J. M.; HRÓBJARTSSON, A.; LALU, M. M.; LI, T.; LODER, E. W.; MAYO-WILSON, E.; MCDONALD, S.; MCGUINNESS, L. A.; STEWART, L. A.; THOMAS, J.; TRICCO, A. C.; WELCH, V. A.; WHITING, P.; MOHER, D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, v. 372, n. 71, 2021. DOI: 10.1136/bmj.n71.

PINHEIRO, H. S. S.; CALAZANS, C. C.; MASIULIONIS, V. E.; ANDRADE, V. S.; CARVALHO, T. S.; GOIS, I. B.; RIBEIRO, G. T.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; BACCI, L. Potential of alternative control of leaf-cutting ants using essential oils: a systematic review. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 27, n. 4, p. 497–511, 2025. DOI: 10.1111/afe.12688.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

RAMOS, V. M.; LEITE, R. G. F.; DE ALMEIDA, V. T.; DA SILVA CAMARGO, R.; CRUZ, J. V. S.; DE LEÃO, R. M.; [autores restantes]; PEREIRA, M. C. S. Bioactivity of *Asclepias curassavica*, *Equisetum* spp. and *Rosmarinus officinalis* extracts against leaf-cutting ants. *Sociobiology*, v. 66, n. 4, p. 536–544, 2019. DOI: 10.13102/sociobiology.v66i4.4271.

SCHWARZER, G.; CARPENTER, J. R.; RÜCKER, G. *Meta-Analysis with R*. 1. ed. Berlin/Heidelberg: Springer International Publishing, 2015. XII, 252 p.

SCOTT, R. P. W. *Techniques and Practice of Chromatography*. Boca Raton: CRC Press, 2020. 416 p.

SILVA, T. D.; CAMARGO, A. D.; SANCHES, L. A.; GARLET, J. *Musa acuminata* pseudostem extract on the control of *Atta sexdens rubropilosa*. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 35, n. 2, p. 459–466, 2019. DOI: 10.14393/BJ-v35n2a2019-41780.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TURCHEN, L. M.; COSME-JÚNIOR, L.; GUEDES, R. N. C. Plant-derived insecticides under meta-analyses: status, biases, and knowledge gaps. *Insects*, v. 11, n. 8, p. 532, 2020. DOI: 10.3390/insects11080532.

VAN BAEL, S. A.; ESTRADA, C.; WCISLO, W. T. Fungal-fungal interactions in leaf-cutting ant agriculture. *Psyche*, v. 2011, p. 617478, 2011. DOI: 10.1155/2011/617478.

ZANETTI, R.; SANCHES, J. J.; WENZEL, A. V. A.; HADDI, K.; FERREIRA, H.; SANTOS, L. V. Isocycloseram: a new active ingredient for leaf-cutting ants control. *PLoS ONE*, v. 19, n. 5, e0300187, 2024. DOI: 10.1371/journal.pone.0300187.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants in Brazilian forest plantations. *Forests*, v. 5, p. 439–454, 2014.

CAPÍTULO 2

Selectively Targeting of Gardeners and Symbiotic Fungus in Leaf-Cutting Ant Colonies Using Essential Oils

Original Research Article Publish in: Journal Insects
Doi: <https://doi.org/10.3390/insects17060645>

Andressa Graebin¹, Patrícia F. Pinheiro², Karina D. Amaral¹, Vinicius F. Santos¹, Tarciza F. Nascimento³, Marcela V. de S. Vilela⁴, Yenara K. M. Silva², Thais D. Marcelino⁴, Raul Narciso C. Guedes^{1*}

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

²Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

³Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

⁴Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil

*Correspondence: guedes@ufv.br; Tel.: 55 (31) 3612-5314

ORCID:

KDA: [0000-0002-3371-0696](https://orcid.org/0000-0002-3371-0696)

TFN: [0000-0002-2814-6998](https://orcid.org/0000-0002-2814-6998)

TDM: [0009-0007-8005-2116](https://orcid.org/0009-0007-8005-2116)

RNCG: [0000-0001-6229-7549](https://orcid.org/0000-0001-6229-7549)

Correspondence to:

Raul Narciso C. Guedes Departamento de Entomologia Universidade Federal de Viçosa, MG 36570-900, Brazil E-mail: guedes@ufv.br

Simple Summary

Leaf-cutting ants are major agricultural pests because they function as highly organized societies, which makes them difficult to control using methods that target individual insects. Therefore, control efforts should focus on limiting the worker ants responsible for feeding the cultivated fungus on which the colony depends. In this study, we tested natural plant extracts, known as essential oils, from five plant species to evaluate their effects on two leaf-cutting ant species and their cultivated fungus. We characterized these oils by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), which revealed contrasting terpenoid profiles dominated by mono- and sesquiterpenes. We assessed whether these oils could harm the fungus or specific worker groups while allowing foraging ants to survive long enough to carry treated bait back to the nest. Most oils showed limited or inconsistent effects. However, ginger oil strongly inhibited fungal growth at high concentrations, and bottlebrush oil was particularly toxic to the workers responsible for maintaining the fungus, while having less effect on foragers. These findings suggest that some plant-derived compounds may help improve pest control strategies by targeting key components of ant colonies. Although further refinement is needed, such approaches could contribute to the development of more environmentally friendly pest management tools.

Abstract

Social insect pests such as leaf-cutting ants challenge conventional pest management because effective control must disrupt colony-level organization rather than target individual insects. Colony persistence depends on the mutualistic association between gardener workers and their cultivated fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*. Compounds that selectively impair these components while preserving forager-mediated bait transport may therefore offer strategic advantages. We evaluated the essential oils of weeping willow (*Salix babylonica*), Surinam cherry (*Eugenia uniflora*), weeping bottlebrush (*Melaleuca viminalis*), ginger (*Zingiber officinale*), and black pepper (*Piper nigrum*) against two leaf-cutting ant species, *Atta sexdens* and *Acromyrmex subterraneus*, after characterizing their chemical composition by GC–MS. The oils displayed distinct terpenoid profiles: bottlebrush oil, for instance, was dominated by 1,8-cineole and α -pinene, while ginger oil was rich in camphene and β -phellandrene. Forager and gardener workers were tested separately, along with their symbiotic fungus. Responses were generally concentration-dependent, although effects varied among oils and biological targets. Ginger oil exhibited strong fungicidal activity, but only at the highest concentration tested (100 mg mL⁻¹). Bottlebrush oil showed marked toxicity to *A. sexdens* gardeners at concentrations as low as 0.10 mg mL⁻¹, while effects on foragers were comparatively low. The remaining oils produced limited or inconsistent responses. These findings indicate that caste-selective toxicity and fungal suppression are achievable but not widespread among essential oils. Bottlebrush oil emerges as a promising candidate for further investigation, particularly regarding its constituent compounds and potential synergistic interactions for toxic bait development.

Keywords: leaf-cutting ants; toxic baits; caste-specific toxicity; fungal symbiosis; essential oils; *Atta sexdens*; *Acromyrmex subterraneus*

1. Introduction

Cooperative brood care, overlapping generations, and reproductive division of labor define eusociality, the highest level of social organization in animals [1,2]. In eusocial systems, colony persistence outweighs individual survival, and specialized castes collectively sustain reproduction, defense, and resource acquisition. Such organization confers ecological success, but also complicates pest management. In eusocial pests, control strategies must suppress the colony as a functional unit rather than eliminate isolated individuals.

Leaf-cutting ants exemplify this challenge. Distributed throughout the Neotropics, species of *Atta* and *Acromyrmex* constitute some of the most significant insect pests in agricultural and forest systems [3–5]. Since the early colonial period in Latin America, these ants have been regarded as a persistent and costly obstacle to crop and timber production [5]. Their economic impact derives not only from intense herbivory but also from the resilience, longevity, and structural complexity of their colonies.

Leaf-cutting ant colonies function as integrated biological systems centered on an obligate mutualism with the cultivated basidiomycete fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Leaf fragments collected by the worker ants are added to the fungal garden, where they are degraded to produce hyphal swellings, the gongylidia, which serve as the colony's primary nutritional source. In addition to nutrient provisioning, the fungus contributes to the detoxification of plant defensive compounds that would otherwise impair colony performance [6,7]. Therefore, colony survival depends on the integrity of this ant–fungus association and on the minor workers, commonly referred to as gardeners, who maintain the fungal substrate [5,8,9]. Conquering such a biological “fortress” is not trivial. Management of leaf-cutting ants depends on suppressing the colony rather than killing exposed individuals [5].

Direct nest treatments are often impractical due to nest size and subterranean complexity. Consequently, control relies primarily on toxic baits composed of attractive organic substrates, typically citrus pulp pellets, impregnated with an insecticidal active ingredient, most commonly sulfluramid or fipronil [5,10]. Effective bait systems require a delicate balance: foraging workers must remain sufficiently functional to transport the bait to the nest, yet the active compound must ultimately impair key colony components, particularly the fungus garden and the minor workers that tend it [5,9,11,12]. Because the queen is deeply protected

within the nest, suppression of gardeners and fungal symbionts constitutes the main pathway affecting queen and colony, leading to colony collapse [13,14].

Despite their efficacy, the active ingredients currently used in toxic baits face increasing regulatory and environmental scrutiny. Fipronil is associated with environmental persistence, soil contamination, and non-target toxicity [15,16], while sulfluramid may degrade into persistent perfluorinated compounds subject to international restriction under the Stockholm Convention [10,15,17,18]. Under certification frameworks such as those adopted by forest stewardship organizations, the continued use of these compounds often depends on derogation procedures [15,19]. As a result, forest-certified companies and integrated pest management programs increasingly seek alternative solutions with reduced environmental footprint, particularly within the realm of bioinsecticides [5,16,19].

Plants constitute a prolific source of biologically active secondary metabolites, evolved as part of their innate defense against herbivores and pathogens [20,21]. Among plant-derived products, essential oils are complex mixtures dominated by terpenoids, phenylpropanoids, and related volatile compounds whose biological activity reflects both individual constituents and potential synergistic interactions [22–24]. Essential oils have demonstrated insecticidal, antimicrobial, and antifungal properties across a range of target organisms, acting through contact, ingestion, or fumigation in insects, and through membrane disruption and interference with cellular integrity in fungi [25–27]. Such properties render them plausible candidates for incorporation into colony-targeted bait systems.

However, research evaluating essential oils against leaf-cutting ants remains comparatively limited and often focuses on worker mortality without distinguishing between castes or considering effects on the symbiotic fungus. Given that colony suppression depends primarily on the integrity of the fungal garden and its attending minor workers, assessing caste-specific responses and fungitoxic activity is therefore essential when evaluating plant-derived compounds for bait-based colony management.

We therefore selected five plant species with documented biological activity and distinct chemical profiles: weeping willow (*Salix babylonica*), Surinam cherry (*Eugenia uniflora*), weeping bottlebrush (*Melaleuca viminalis*), ginger (*Zingiber officinale*), and black pepper (*Piper nigrum*). These species were chosen based on previous reports of insecticidal and/or antifungal activity of their extracts or essential oils against agricultural pests and phytopathogenic fungi, the presence of bioactive terpenoids and phenolics, and their local

availability for extraction [28–32]. Despite this evidence, their effects on leaf-cutting ants and the mutualistic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* remain largely unexplored, justifying their evaluation as candidates for colony-targeted control.

Two economically important leaf-cutting ant species were assessed: the parasol ant (*Atta sexdens*) and the quenquém (*Acromyrmex subterraneus*). Foragers and gardeners were tested separately, along with the cultivated fungus *L. gongylophorus*. We hypothesized that essential oil toxicity would vary with concentration and biological target, potentially revealing differential susceptibility among worker castes and measurable effects on fungal growth. We further hypothesized that selective impairment of gardeners and/or fungal development, coupled with comparatively lower toxicity to foragers, would represent a desirable profile for potential incorporation into toxic bait systems aimed at colony-level suppression. Thus, this study moves beyond conventional screening by integrating colony-functional targets with complex botanical oils.

2. Materials and Methods

2.1 Collection and identification of botanical materials

Plant materials were collected in Minas Gerais and Espírito Santo States, Brazil, and voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Federal University of Viçosa, where taxonomic identification was performed by specialists following standard herbarium procedures (Mori et al., 1989). Voucher codes were assigned as follows: weeping willow (*Salix babylonica*) – VIC58262; weeping bottlebrush (*Melaleuca viminalis*) – VIC58261; and Surinam cherry (*Eugenia uniflora*) – VIC58260. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*) were obtained commercially in Viçosa (MG, Brazil), and black pepper grains (*Piper nigrum*) were collected at Água Boa Farm, São Mateus, Espírito Santo, Brazil (18°4'36"S, 40°02'49"W).

Plant material was cleaned to remove debris, and leaves or rhizomes were chopped into small fragments immediately prior to hydrodistillation to minimize the loss of volatile constituents, following standard procedures for essential oil extraction.

2.2 Essential oil extraction and yield

Fresh leaves of weeping willow (*S. babylonica*), Surinam cherry (*E. uniflora*) and weeping bottlebrush (*M. viminalis*), as well as ginger rhizomes (*Z. officinale*), were divided into three 100 g portions for hydrodistillation. For the black pepper, three 50 g portions of dried peppercorns were used. The samples were homogenized with 1 L of distilled water and subjected to hydrodistillation for 3 h using a modified Clevenger-type apparatus connected to

a 2 L round-bottom flask, following established protocols for essential oil extraction carried out in triplicate [33].

The essential oils of Surinam cherry and ginger were collected by decantation. For the remaining species, the oils were recovered from the hydrosol (200 mL) by extraction with dichloromethane (3×15 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. Yields were determined gravimetrically, and the oils were stored in amber vials at -5 °C until use. Chemical composition was determined by GC–MS (Shimadzu GCMS-QP2010C Ultra) equipped with an SPB-5 capillary column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$). Helium was used as carrier gas at 1.60 mL min^{-1} . The oven temperature was programmed from 40 °C to 300 °C at 5 °C min^{-1} . Injector and detector temperatures were 220 °C and 300 °C, respectively [34]. Compounds were identified by comparison of mass spectra with NIST library data and literature references, supported by calculation of linear retention indices (LRI) relative to n-alkane standards [35].

2.3 Ant colonies

Colonies of the parasol ant (*Atta sexdens*) and the quenqué (Acromyrmex subterraneus) were collected in Viçosa, Minas Gerais, Brazil ($20^{\circ}45'14''\text{S}$, $42^{\circ}52'54''\text{W}$) and maintained under controlled laboratory conditions (25 ± 5 °C; $75 \pm 5\%$ RH; 12:12 h L:D) as previously detailed [36]. Colonies were provisioned daily with acalypha leaves (*Acalypha wilkesiana*) and water, and they were maintained under controlled conditions of temperature (25 ± 5 °C), relative air humidity ($75 \pm 5\%$), and photoperiod (12h:12h, light/dark). Fungus gardens averaged approximately 1 L per colony. Colonies were deprived of fresh substrate for 24 h prior to bioassays to standardize physiological conditions [37]

2.4 Toxicity bioassays with worker ants

Toxicity was evaluated separately for foraging (head capsule 2.0 – 2.2 mm) and gardening workers (0.8 – 1.0 mm) from five independent colonies per species. Topical application was employed as a standardized laboratory exposure method to ensure controlled dosing. Essential oils were diluted in 0.50% Tween 80 in distilled water at concentrations of 0.0001 , 0.001 , 0.01 , 0.1 , and 1 mg mL^{-1} . The control consisted of 0.50% Tween 80 in distilled water. These concentrations were selected based on previous studies evaluating essential oils and terpenoid components against insect pests, and on preliminary range-finding assays aimed at spanning sublethal to clearly lethal exposure levels.

For each essential oil and caste, five replicates were used, each consisting of 10 workers and individuals originating from a single colony to preserve colony-level independence. Individuals were maintained in Petri dishes (10 cm diameter) with water and honey solution (1:1). Foraging workers received 1 μL of solution applied to the thorax; gardening workers received 0.5 μL [42]. These volumes were chosen based on preliminary body-mass measurements and pilot assays, in which gardeners displayed approximately half the body mass of foragers, so that 0.5 μL in gardeners and 1 μL in foragers delivered a comparable dose per unit body mass without causing solvent-related mortality or obstructing spiracles and appendages. Controls received equivalent volumes of solvent solution. Mortality was recorded daily for seven days, and time-to-death (days) was used for survival analysis. Overall, concentration-dependent toxicity in *quenquém* is likely oil- and caste-specific, with clearer effects likely observed among gardeners than foragers, notwithstanding the use of body-mass-adjusted volumes to approximate similar dose per unit mass between castes.

2.5 Toxicity bioassays with the symbiotic fungus

The fungus was isolated from nests of the parasol leafcutter ant by removing a small portion from the youngest part of the garden, a gray-colored region, and then aseptically transferring it to Petri dishes containing culture medium. The culture medium contained peptone, sodium chloride, malt extract, glucose, rolled oats, agar, distilled water, and rifampicin to prevent bacterial contamination. Media were autoclaved at 120 °C and 1.1 atm for 30 min [38].

The preliminary screening was conducted at 100 mg mL⁻¹ (10 plates per essential oil and 10 control Petri dishes). The screening concentration and subsequent dilution series were chosen in line with published fungitoxicity assays of essential oils on phytopathogenic fungi and with our initial range-finding tests. Ginger and bottlebrush essential oils were subsequently evaluated at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg mL⁻¹, using 10 plates per concentration for each oil and 10 plates for the corresponding solvent control [39]. Oils were diluted in 0.50% Tween 80 in distilled water, and 100 μL were spread evenly onto the medium surface using a Drigalski loop to ensure uniform distribution. Controls received solvent only. A 1 cm-diameter fungal plug was placed at the center of each plate (10 mL of medium per plate). Plates were sealed and incubated at 25 $\pm$ 2 °C for 30 days. Fungal growth was quantified by measuring colony area using ImageJ [40], and by determining final dry mass after oven-drying at 28 °C until constant weight.

2.6 Statistical analyses

Survival analyses of both leaf-cutting ant species (*A. sexdens* and *Ac. subterraneus*) were performed separately for foraging and gardening castes exposed to different concentrations of essential oils. Time to death (days) was recorded for each individual, and survival curves were constructed using Kaplan–Meier estimators for each extract-concentration combination. Analyses were conducted in R using the survival, survminer, multcompView, and dplyr packages. The Surv() function was used to create survival objects from time and event (death or censoring) variables. Models were fitted using survfit(), stratified by concentration within each essential oil. Survival curves were plotted using ggsurvplot(), and global differences among concentrations were assessed using the log-rank (Peto–Peto) test [41]. When the global test was significant, pairwise log-rank comparisons among concentrations were performed and *p*-values were adjusted using Bonferroni correction to control the family-wise error rate within each essential-oil × caste × species combination.

Fungal growth area and dry mass were initially assessed for normality (Shapiro–Wilk) and homogeneity of variances (Bartlett). As assumptions were not met and the Box–Cox transformation was unsuccessful, treatments were compared using the Kruskal–Wallis test, followed by multiple comparisons (*agricolae* package). For essential oils exhibiting concentration-dependent responses (ginger and bottlebrush), linear regression models were fitted to evaluate the relationship between concentration (log-transformed) and fungal growth parameters. Model assumptions were verified prior to interpretation. Results are presented as regression coefficients, R^2 , *F* statistics, and *p*-values.

3. Results

3.1 Chemical composition, identification, and yield of essential oils

The chemical composition of the essential oils is presented in Table 1. The yield of essential oil from weeping willow leaves was 0.77% (m/m), with bicyclogermacrene (19.75%), spathulenol (18.29%), and myrcene (16.02%) as the major constituents. Surinam cherry leaves yielded 0.82% (m/m), with germacrone (36.57%), ledene (6.39%), and selina-3,7(11)-diene (2.89%) as the predominant components. In contrast, the essential oil yield from weeping bottlebrush leaves was lower (0.53% m/m) and was characterized by a strong predominance of 1,8-cineole (75.77%), followed by α -pinene (17.32%) and 3-cyclohexene-1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl (3.00%). The highest yields were obtained from ginger (1.82% m/m) and black pepper (1.40% m/m). Ginger essential oil was mainly composed of camphene (34.93%), β -

phellandrene (27.91%), and α -pinene (11.86%), whereas black pepper essential oil was dominated by cis-caryophyllene (37.27%), limonene (21.41%), and β -pinene (12.67%).

Table 1. Chemical characterization of the essential oils from weeping willow (*Salix babylonica*), Surinam cherry (*Eugenia uniflora*), weeping bottlebrush (*Melaleuca viminalis*), ginger (*Zingiber officinale*), and black pepper (*Piper nigrum*).

Constituents		AI (calc.)	AI (lit.)	Relative peak area (%)				
				Weeping willow (<i>S. babylonica</i>)	Surinam cherry (<i>E. uniflora</i>)	Weeping bottlebrush (<i>M. viminalis</i>)	Ginger (<i>Z. officinale</i>)	Black pepper (<i>P. nigrum</i>)
1	α -Thujene	942	924	-	-	-	-	0.55
2	Camphene	945	946	-	-	-	35.17	-
3	α -Pinene	948	932	0.95	-	17.32	11.95	5.71
4	Sabinene	989	969	13.23	-	-	-	4.76
5	β -Pinene	991	974	-	-	1.74	-	12.67
6	α -Phellandrene	1003	1002	-	-	-	1.04	-
7	Myrcene	1008	988	-	-	0.40	2.72	1.58
8	β -Myrcene	1008	NI	16.02	-	-	-	-
9	β - Phellandrene	1027	1025	0.37	-	-	28.11	-
10	1,8-Cineole	1029	1026	-	-	75.77	5.72	-
11	Propanoic acid, 2-methyl, pentyl ester	1030	1049	-	-	1.23	-	-
12	α -Terpinene	1032	1014	0.12	-	-	-	-
13	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)- (CAS) 1-Methyl-2-isopropylbenzene	1039	NI	0.17	-	-	-	-
14	Limonene	1044	1024	-	-	-	-	21.41
15	γ -Terpinene	1074	1054	0.23	-	0.54	-	-
16	Furan, 3-(4-methyl-3-pentenyl)- (CAS) Perillen	1117	1102	0.46	-	-	-	-
17	3-cyclohexene-1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl	1206	1186	-	-	3.00	-	-
18	3,7-Nonadien-2-one, 8-methyl	1260	NI	-	-	-	1.26	-
19	α -Copaene	1392	1374	-	-	-	-	6.24
20	(-)-Elema-1,3,11(13)-trien-12-ol	1410	-	-	0.45	-	-	-
21	Trans-caryophyllene	1437	1417	13.47	1.45	-	-	-
22	cis-caryophyllene	1438	1408	-	-	-	-	37.27
23	α -Amorphene	1457	1483	-	0.85	-	-	-

24	α -Humulene	1470	1452	0.99	-	-	-	2.34
25	α -Zingiberene	1480	1493	-	-	-	10.04	-
26	Farnesene <(E,E)- α ->	1492	1505	-	-	-	2.51	-
27	Germacrene D	1498	1480	7.22	-	-	-	-
28	Trans- β -Guaiene	1505	1502	-	0.25	-	-	-
29	β -Sesquiphellandrene	1507	1521	-	-	-	1.49	-
30	Ledene	1515	1496	-	6.39	-	-	-
31	Bicyclogermacrene	1515	1500	19.75	-	-	-	-
32	Curzerene	1516	1499	-	1.36	-	-	-
33	β -Bisabolene	1525	1505	-	-	-	-	3.29
34	δ -Cadinene	1540	1522	-	-	-	-	1.81
35	NI	1555	1452	-	4.77	-	-	-
36	Selina-3,7(11)-diene	1562	1545	-	2.89	-	-	-
37	Spathulenol	1596	1577	18.29	-	-	-	-
38	Caryophyllene oxide	1600	1582	8.73	-	-	-	2.36
39	Germacrone	1718	1693	-	36.57	-	-	-
40	NI	1775	1476	-	24.44	-	-	-
41	NI	1779	1476	-	20.58	-	-	-

TR = retention time; AI (calc.) = calculated arithmetic index; AI (lit.) = literature arithmetic index; %Area = relative peak area calculated from the chromatogram; NI = not identified.

3.2. Toxicity of essential oils to quenquém workers

Among quenquém foragers, survival differed significantly across concentrations when exposed to black pepper and ginger essential oils ($\chi^2 \geq 32.60$; d.f. = 5; $p \leq 0.005$) (Figure 1). In contrast, no significant concentration-dependent effect was observed for weeping willow, weeping bottlebrush, or Surinam cherry essential oils ($\chi^2 \leq 8.97$; d.f. = 5; $p \geq 0.11$). For quenquém gardeners, significant differences in survival were detected for all essential oils ($\chi^2 \geq 23.8$; d.f. = 5; $p < 0.001$), except for weeping bottlebrush ($\chi^2 = 6.0$; d.f. = 5; $p = 0.31$) (Figure 2). Overall, concentration-dependent toxicity in quenquém was oil- and caste-specific, with clearer effects observed among gardeners than foragers.

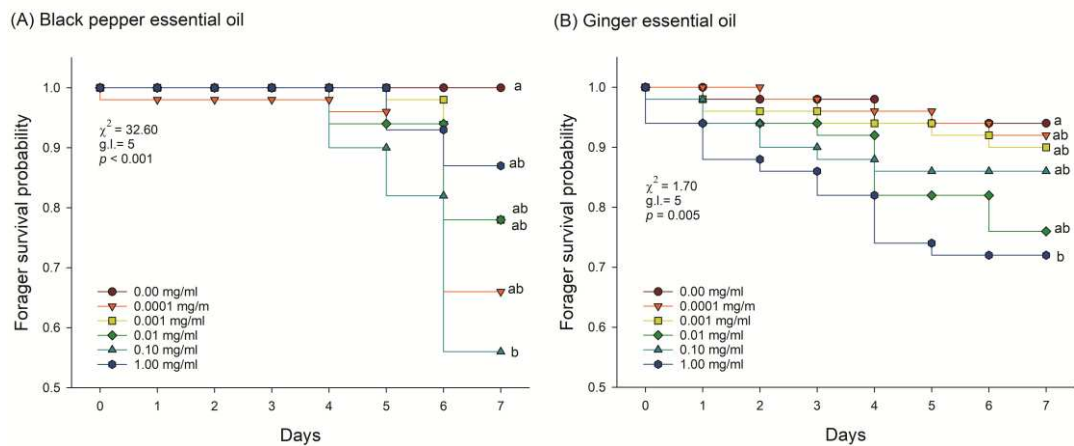


Figure 1. Kaplan–Meier survival curves showing the cumulative survival probability of quenquém forager ants (*Acromyrmex subterraneus*) following topical application of essential oils at concentrations of 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg mL⁻¹. Curves sharing the same letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

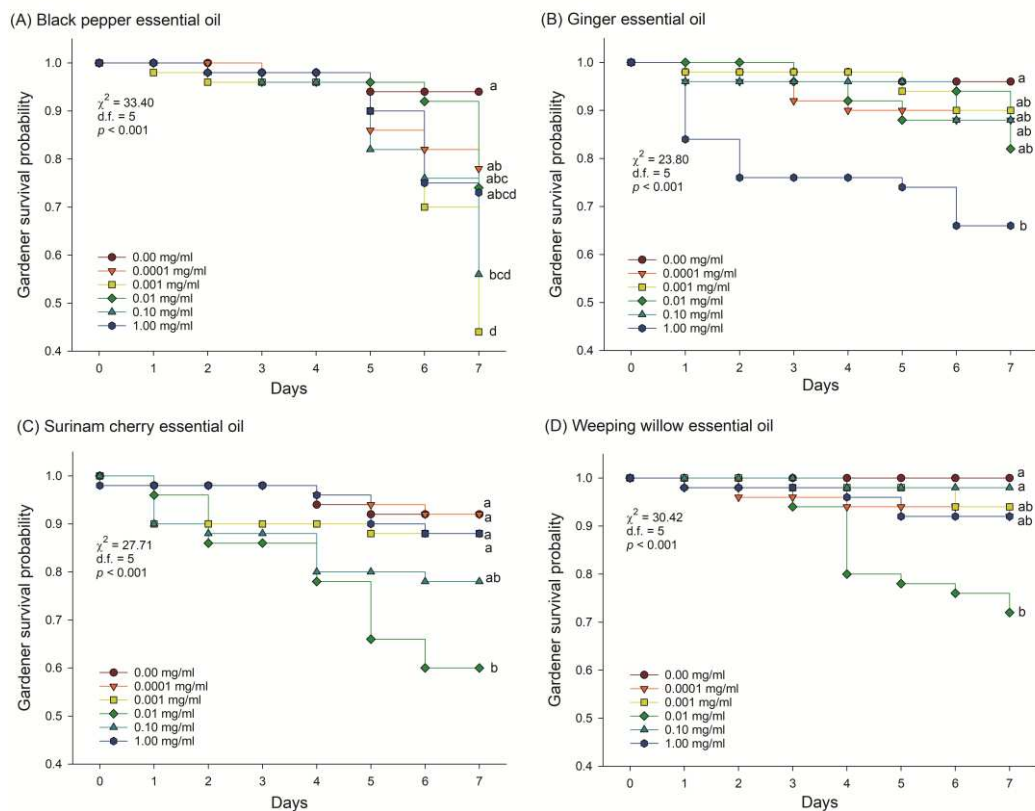


Figure 2. Kaplan–Meier survival curves showing the cumulative survival probability of quenquém gardener ants (*Acromyrmex subterraneus*) following topical application of essential oils at concentrations of 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg mL⁻¹. Curves sharing the same letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

3.3. Toxicity of essential oils to parasol leafcutter workers

Among parasol leafcutter workers (*Atta sexdens*), no significant concentration-dependent effect was observed for foragers exposed to weeping willow or ginger essential oils ($\chi^2 \leq 5.52$; d.f. = 5; $p \geq 0.36$). Across treatments, no consistent concentration–mortality

relationship was detected for leafcutter foragers ($\chi^2 \leq 8.70$; d.f. = 5; $p \geq 0.12$). In contrast, gardener survival differed significantly across concentrations for the essential oils of weeping bottlebrush, black pepper, and Surinam cherry ($\chi^2 \geq 15.7$; d.f. = 5; $p \leq 0.008$) (Figure 3). Across treatments, no consistent concentration–mortality relationship was detected for leafcutter foragers ($\chi^2 \leq 8.70$; d.f. = 5; $p \geq 0.12$). Thus, at the tested concentrations, essential oils exhibited limited toxicity toward leafcutter foragers, whereas bottlebrush, black pepper, and Surinam cherry oils showed insecticidal activity against gardeners.

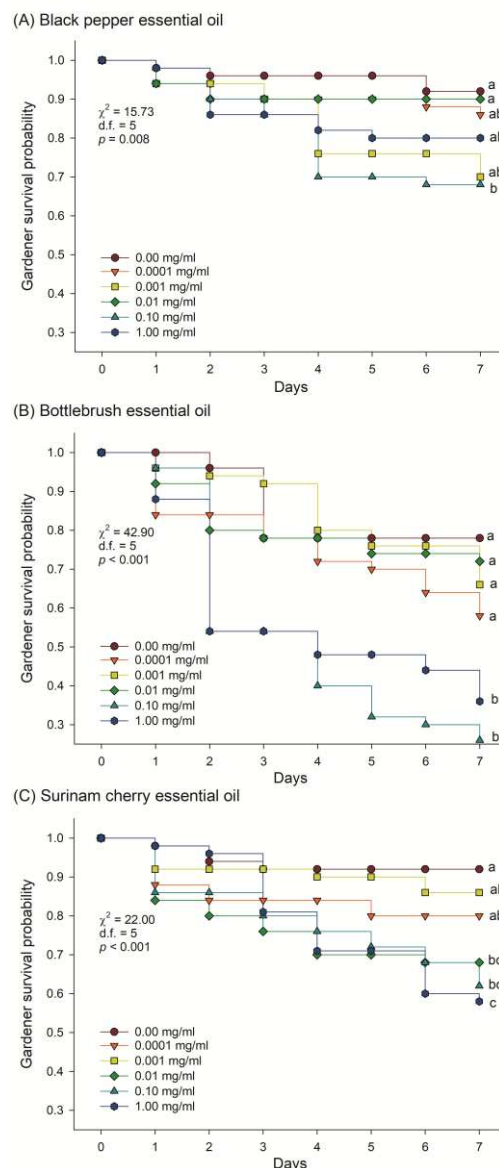


Figure 3. Kaplan–Meier survival curves showing the cumulative survival probability of parasol leafcutter worker ants (*Atta sexdens*) following in vitro topical application of essential oils at concentrations of 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg mL⁻¹. Curves sharing the same letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

3.4. Toxicity of essential oils to the symbiotic fungus *L. gongylophorus*

In the control treatment, no inhibition of *L. gongylophorus* growth was observed. Control values were therefore used as the baseline to estimate inhibition in the essential oil treatments. The mean fungal growth area in the control was approximately 150 cm², indicating normal development and differing significantly from treatments containing essential oils at 100.00 mg mL⁻¹ ($H = 20.18$; d.f. = 5; $p < 0.001$) (Figure 4).

All essential oils significantly reduced fungal growth area and dry mass relative to the control (Figure 4). Bottlebrush and ginger essential oils completely suppressed mycelial development at 100.00 mg mL⁻¹, resulting in visually undetectable growth and near-zero fungal biomass, consistent with strong fungicidal activity. Surinam cherry essential oil exhibited partial inhibition, with a mean growth area of approximately 20 cm². In contrast, weeping willow and black pepper oils caused moderate reductions in growth, with mean areas of approximately 50 cm² and 80 cm², respectively (Figure 4).

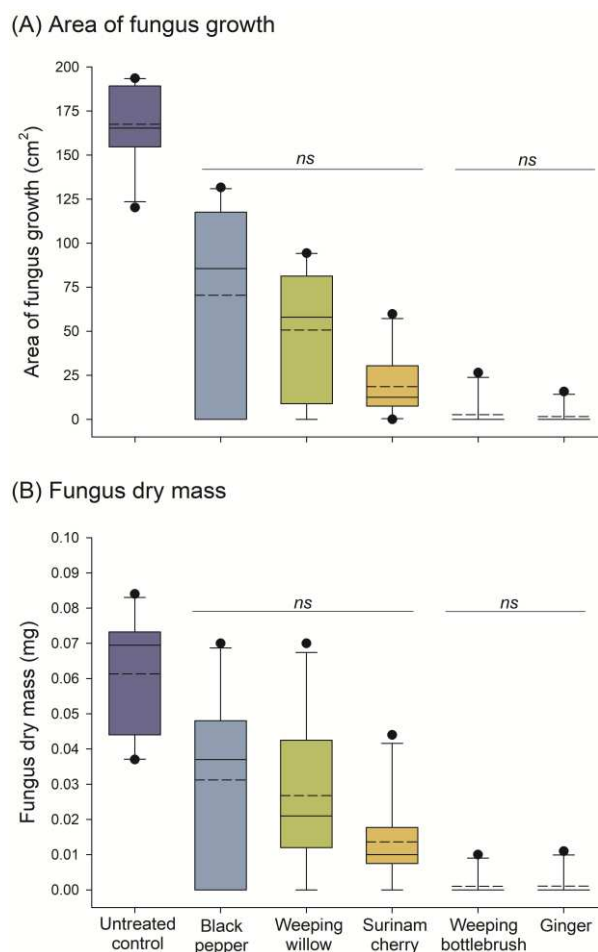


Figure 4. Effects of essential oils (100 mg mL⁻¹) on (A) growth area (cm²) and (B) dry mass (g) of the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Comparisons among treatments were performed using the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$). Boxplots represent data distribution, with the horizontal line indicating the median; points beyond the whiskers are considered outliers. The notation “ns” indicates no significant difference among treatments.

Given their pronounced inhibitory effects at 100.00 mg mL⁻¹, bottlebrush and ginger essential oils were further evaluated in concentration–response assays using lower concentrations up to the initial screening level. However, bottlebrush essential oil did not exhibit a significant concentration-dependent effect on fungal growth area or dry mass across the tested range (Figure 4). In contrast, ginger essential oil significantly reduced fungal growth area and dry mass at concentrations above 10.00 mg mL⁻¹ (Figure 5).

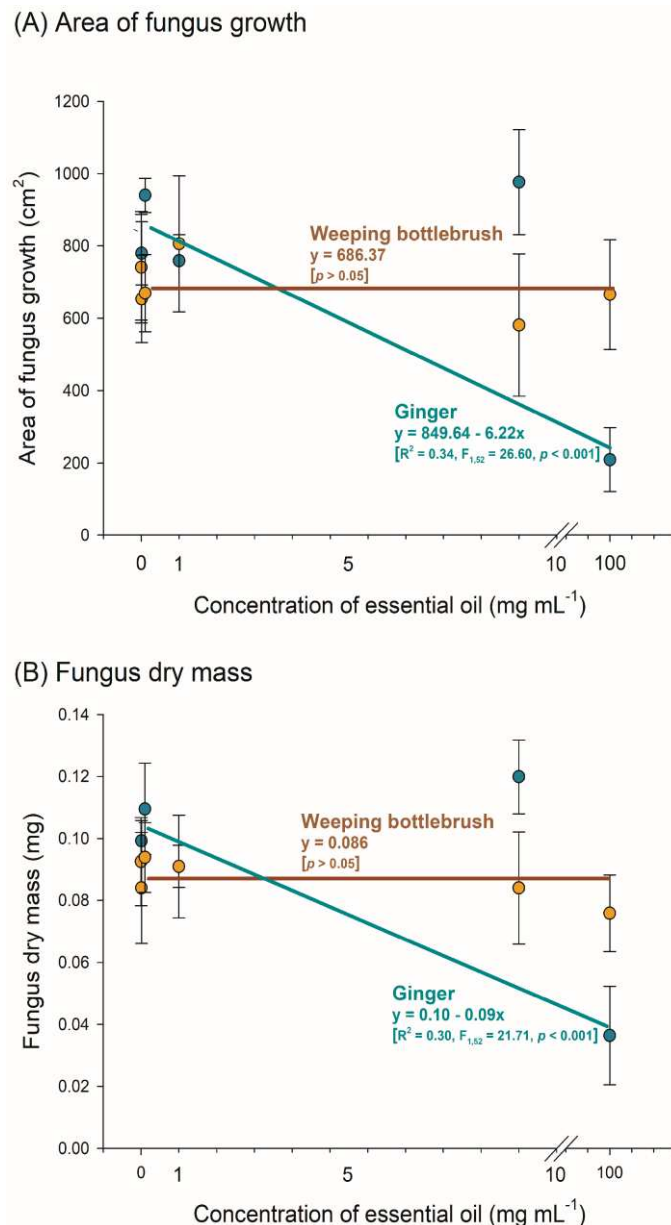


Figure 5. Effects of essential oils from ginger (*Zingiber officinale*) and weeping bottlebrush (*Melaleuca viminalis*) on (A) growth area (cm²) and (B) mass (g) of the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*.

4. Discussion

The growing interest in bioinsecticides reflects societal and regulatory concerns regarding the environmental persistence and non-target effects of conventional synthetic

pesticides [23,42]. However, the distinction between ‘natural’ and ‘synthetic’ does not equate to safety, and both require careful ecological scrutiny [43–45]. While stored-product and commodity pests dominate the bioinsecticide literature, comparatively little attention has been directed toward social insect pests such as leaf-cutting ants [46]. Consequently, progress in developing effective ant baits based on bioinsecticides remains limited, with only a few preliminary candidates showing potential [11,13,47,48].

The design of toxic ant baits imposes specific biological constraints. Effective compounds must exhibit low toxicity toward foragers—so as not to prevent bait transport to the nest—while affecting gardeners, queens, or the symbiotic fungus responsible for colony nutrition [5,8,14]. Additionally, high vapor pressure, rapid degradation, or excessive acute toxicity may impair colony-level suppression; for example, overly fast-acting compounds can kill foragers before they return to the nest, reducing bait intake and limiting downstream effects on gardeners and the fungus [5,11]. These constraints partly explain the continued reliance on sulfluramid and fipronil, despite regulatory restrictions and derogations [10].

In this context, we evaluated the bioinsecticidal potential of essential oils from five plant species against two worker castes, foragers and gardeners, of two leaf-cutting ant species, and against their symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. We hypothesized that toxicity would be caste-dependent and concentration-dependent, and that fungal growth would be susceptible to oil exposure. Our results partially support these hypotheses.

Caste-specific responses were evident. Concentration-dependent effects were more pronounced among gardener workers than foragers, particularly for black pepper and Surinam cherry essential oils. Ginger and willow oils showed concentration-dependent responses only in quenquém gardeners, whereas bottlebrush oil affected *Atta sexdens* gardeners. Importantly, forager mortality was generally low, a desirable characteristic for bait-based delivery systems. However, gardener mortality rarely exceeded 50% after seven days, which falls below the efficacy typically required for registration of conventional insecticides in Brazil [49]. Thus, although selective activity toward gardeners was observed, the magnitude of insecticidal effects was limited. Nonetheless, even partial suppression of gardener workers may increase fungal vulnerability by reducing maintenance and hygiene behaviors, potentially delaying colony destabilization.

The essential oils evaluated here were dominated by mono- and sesquiterpenes, including α - and β -pinene, limonene, 1,8-cineole, bicyclogermacrene, germacrone, and

caryophyllene derivatives. Many of these compounds have been associated with insecticidal, repellent, or fungitoxic activity, acting through neurotoxicity, membrane disruption, and interference with cellular integrity [22,25–27]. For example, camphene, germacrone, and α -humulene have shown significant toxicity towards Lepidopteran and mite pests, while monoterpenes such as limonene and 1,8-cineole can impair both insects and fungi [50,51].

The relative peak area profiles in Table 1 suggest that oils enriched in monoterpenes, as in ginger and bottlebrush, may favor stronger acute or fungicidal effects, whereas oils with higher proportions of sesquiterpenes, such as Surinam cherry, displayed more moderate or inconsistent responses in our assays [22,23,25–27,50–53]. At the same time, the biological activity of essential oils arises from the combined action of major and minor constituents, including synergistic and antagonistic interactions [54], so our GC–MS data should be viewed as indicative rather than strictly predictive of individual compound effects [22–24,54]. The relatively modest toxicity observed here suggests that optimization through fractionation, formulation, or synergistic combinations would likely be required to enhance activity toward target castes.

Within this framework, some major constituents emerge as likely contributors to the observed activity. Bottlebrush oil contained high levels of 1,8-cineole and α -pinene, which have been frequently implicated in insecticidal and fungitoxic effects. Ginger oil was enriched in camphene and β -phellandrene, compounds that have shown toxicity to lepidopteran larvae and stored-product pests, whereas black pepper oil was dominated by cis-caryophyllene and limonene, both associated with insecticidal or repellent properties in other systems. The stronger fungicidal effect of ginger oil and the caste-biased toxicity of bottlebrush oil are therefore consistent with the presence of these active terpenoids, although the complex mixture and potential interactions among constituents preclude definitive attribution to any single compound [21–23,48].

At the mechanistic level, monoterpenes and sesquiterpenes can act on insects by disrupting cuticular and cellular membranes, altering ion gradients, inhibiting acetylcholinesterase and other neural enzymes, and inducing oxidative stress [22,24,27]. In phytopathogenic fungi, similar compounds interfere with ergosterol biosynthesis and membrane integrity, leading to leakage of intracellular constituents and impaired growth [25,26,54]. Numerous studies also indicate that combinations of terpenoids can exhibit synergistic or antagonistic interactions, so that the efficacy of an essential oil often exceeds what would be predicted from its major components alone [55]. The moderate but selective

effects observed here are therefore likely to arise from both the activity of individual compounds and their interactions within each oil.

An alternative and potentially more promising target for ant bait development is the symbiotic fungus *L. gongylophorus*, which sustains colony growth [6]. Essential oils are known to disrupt fungal membrane integrity, interfere with ergosterol biosynthesis, and alter cell permeability [22,25]. In our study, only bottlebrush and ginger essential oils completely suppressed fungal growth at 100 mg mL⁻¹. However, when tested across a broader concentration range, only ginger oil maintained a significant concentration-dependent effect, but only at higher doses.

The discrepancy observed for bottlebrush oil between the initial screening and subsequent concentration-response assays may reflect compositional instability or volatility-driven changes during storage and handling. As shown in Table 1, bottlebrush oil is dominated by the monoterpenes 1,8-cineole and α -pinene, which are relatively volatile and susceptible to oxidative degradation and evaporative loss during storage, heating, or repeated handling. A reduction in the proportion or absolute amount of these major constituents between the screening and follow-up assays could plausibly attenuate fungicidal potency, particularly at lower concentrations.

Essential oil composition is known to vary with extraction method, storage conditions, temperature, light exposure, and plant phenological stage [27]. Such variability can directly influence biological activity and highlights the need to monitor chemical stability in bioassay-driven studies. At the same time, we cannot exclude contributions from experimental variation, including differences among fungal subcultures and plate-to-plate variability, to the inconsistent bottlebrush response across assays.

Overall, ginger essential oil demonstrated fungicidal activity at high concentrations and limited caste-selective insecticidal effects, whereas bottlebrush oil exhibited moderate gardener toxicity and strong fungal inhibition at the screening concentration. Similar to other studies with plant-derived products against social insects, the efficacy observed here is lower than that of established synthetic active ingredients such as sulfluramid and fipronil, which still underpin most operational bait formulations despite regulatory constraints. This reinforces the notion that essential oils alone are unlikely to provide complete and reliable suppression of mature leaf-cutting ant colonies.

Given the biological complexity and resilience of leaf-cutting ant societies, practical control strategies will likely require multi-target approaches that disrupt both worker castes and the symbiotic fungus, and that integrate different modes of action [5,9,11–13]. In this context, essential oils and their purified constituents may be better positioned as components of integrated bait systems—either as co-active ingredients, synergists, or fungitoxic additives—rather than stand-alone replacements for current insecticides [22,24] [21–23,48,54]. Our findings thus highlight the importance of targeting functionally distinct components of social insect colonies and provide initial guidance for selecting chemical profiles that merit further optimization through formulation, fractionation, and synergistic combinations.

Author Contributions: Conceptualization, A.G., P.F.P. and R.N.C.G.; methodology, A.G., P.F.P., K.D.A. and R.N.C.G.; software, P.F.P. and R.N.C.G.; validation, A.G., K.D.A. and V.F.S.; formal analysis,

A.G. and V.F.S.; investigation, A.G., T.F.N., M.V.d.S.V., Y.K.M.S. and T.D.M.; resources, P.F.P. and R.N.C.G.; data curation, A.G. and V.F.S.; writing—original draft preparation, A.G., P.F.P., K.D.A. and R.N.C.G.; writing—review and editing, A.G., P.F.P., K.D.A. and R.N.C.G.; visualization, A.G., V.F.S. and R.N.C.G.; supervision, P.F.P. and R.N.C.G.; project administration, P.F.P. and R.N.C.G.; funding acquisition, R.N.C.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), the CAPES Foundation (Brazilian Ministry of Education; Financial Code 001), and the Minas Gerais State Foundation of Research Aid (FAPEMIG).

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to CNPq, CAPES and FAPEMIG for the financial support provided.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Wilson, E.O. *Sociobiology: The New Synthesis. Planet Savers: 301 Extraordinary Environmentalists*; Harvard University: Cambridge, MA, USA, 1975; 697p.
2. Wilson, E.O.; Hölldobler, B. Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13367–13371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Santos, A.; Santos, I.C.L.; Silva, N.; Zanetti, R.; Oumar, Z.; Guimarães, L.F.R.; de Camargo, M.B.; Zanuncio, J.C. Mapping defoliation by leaf-cutting ants *Atta* species in Eucalyptus plantations using the Sentinel-2 sensor. *Int. J. Remote Sens.* **2020**, *41*, 1542–1554.
4. Montoya-Lerma, J.; Giraldo-Echeverri, C.; Armbrrecht, I.; Farji-Brener, A.; Calle, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int. J. Pest Manag.* **2012**, *58*, 225–247. [[CrossRef](#)]
5. Della Lucia, T.M.; Gandra, L.C.; Guedes, R.N. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci.* **2014**, *70*, 14–23. [[PubMed](#)]
6. Rønshede, S.; Boomsma, J.J.; Rosendahl, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. *Mycol. Res.* **2004**, *108*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fowler, H.G.; Pagani, M.I.; Silva, O.A.; Forti, L.C.; Silva, V.P.; Vasconcelos, H.L. A pest is a pest is a pest? The dilemma of neotropical leaf-cutting ants: Keystone taxa of natural ecosystems. *Environ. Manag.* **1989**, *13*, 671–675. [[CrossRef](#)]
8. Antunes, E.C.; Guedes, R.N.C.; Lucia, T.M.C.D.; Serrão, J.E. Sub-lethal effects of abamectin suppressing colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* subterraneus. *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 1059–1064. [[CrossRef](#)]
9. Gandra, L.C.; Amaral, K.D.; Couceiro, J.C.; Della Lucia, T.M.; Guedes, R.N. Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Manag. Sci.* **2016**, *72*, 1475–1481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Britto, J.S.D.; Forti, L.C.; Oliveira, M.A.D.; Zanetti, R.; Wilcken, C.F.; Zanuncio, J.C.; Loeck, A.E.; Caldato, N.; Nagamoto, N.S.; Alves, P.G.L.; et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* **2016**, *3*, 11–92. [[CrossRef](#)]
11. Antunes, E.C.; Della Lucia, T.M.C.; Guedes, R.N.C.; Serrao, J.E. Abamectin-driven alterations on queen ovaries of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*

- subterraneus* (Hymenoptera: *Formicidae*). *Sociobiology* **2005**, *45*, 163–172.
12. Amaral, K.D.; Gandra, L.C.; de Souza, D.J.; Della Lucia, T.M.C. Deleterious action of azadirachtin against the mutualistic fungus of leaf-cutting ants. *J. Basic Microbiol.* **2020**, *60*, 931–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 13. Forest Stewardship Council [FSC]. *List of Approved Derogations for Use of 'Highly Hazardous' Pesticides*; Forest Stewardship Council: Bonn, Germany, 2019.
 14. Vinha, G.L.; Alcántara-de la Cruz, R.; Castro Della Lucia, T.M.; Wilcken, C.F.; Dias da Silva, E.; Lemes, P.G.; Zanuncio, J.C. Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: Biological aspects and control methods. *South. For.* **2020**, *82*, 95–103. [[CrossRef](#)]
 15. United Nations Environmental Programme [UNEP]. Review and Update of the National Implementation Plan for the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) in Brazil. Nairobi, Kenya. 2016. Available online: <https://www.thegef.org/projects-operations/projects/9530> (accessed on 6 June 2026).
 16. Gilljam, J.L.; Leonel, J.; Cousins, I.T.; Benskin, J.P. Additions and Correction to Is Ongoing Sulfluramid Use in South America a Significant Source of Perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production Inventories, Environmental Fate, and Local Occurrence. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 653–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 17. Zanetti, R.; Zanuncio, J.C.; Santos, J.C.; Da Silva, W.L.P.; Ribeiro, G.T.; Lemes, P.G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: *Formicidae*) in Brazilian forest plantations. *Forests* **2014**, *5*, 439–454. [[CrossRef](#)]
 18. Divekar, P.A.; Narayana, S.; Divekar, B.A.; Kumar, R.; Gadratagi, B.G.; Ray, A.; Singh, A.K.; Rani, V.; Singh, V.; Singh, A.K.; et al. Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 19. Zhang, S.; Zhu, W.; Wang, B.; Tang, J.; Chen, X. Secondary metabolites from the invasive *Solidago canadensis* L. accumulation in soil and contribution to inhibition of soil pathogen *Pythium ultimum*. *Appl. Soil Ecol.* **2011**, *48*, 280–286. [[CrossRef](#)]
 20. Bakkali, F.; Averbek, S.; Averbek, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 21. Turchen, L.M.; Cosme-Júnior, L.; Guedes, R.N.C. Plant-derived insecticides under meta-analyses: Status, biases, and knowledge gaps. *Insects* **2020**, *11*, 532. [[CrossRef](#)]

[PubMed]

22. Collares, L.J.; Turchen, L.M.; Guedes, R.N.C. Research trends, biases, and gaps in phytochemicals as insecticides: Literature survey and meta-analysis. *Plants* **2023**, *12*, 318. [CrossRef] [PubMed]
23. Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. [CrossRef] [PubMed]
24. Lang, G.; Buchbauer, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Pest Manag. Sci.* **2012**, *27*, 13–39.
25. Sousa, P.D.; Damasceno, R.O.S.; Amorati, R.; Elshabrawy, H.A.; de Castro, R.D.; Bezerra, D.P.; Nunes, V.R.V.; Gomes, R.C.; Lima, T.C. Essential Oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1144. [CrossRef] [PubMed]
26. Ahmad, N.; Fazal, H.; Abbasi, B.H.; Farooq, S.; Ali, M.; Khan, M.A. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, S1945–S1953. [CrossRef]
27. González-Alamilla, E.N.; Gonzalez-Cortazar, M.; Valladares-Carranza, B.; Rivas-Jacobo, M.A.; Herrera-Corredor, C.A.; Ojeda-Ramírez, D.; Zaragoza-Bastida, A.; Rivero-Perez, N. Chemical Constituents of *Salix babylonica* L. and Their Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Animal Bacteria. *Molecules* **2019**, *24*, 2992. [CrossRef] [PubMed]
28. Sutar, N.; Sutar, R.; Kumar, M. *Callistemon citrinus* (bottle brush) an important medicinal plant: A review of its traditional uses, phytoconstituents and pharmacological properties. *Indian Res. J. Pharm. Sci.* **2014**, *1*, 68–77.
29. Ugwu, J.A.; Alabi, O.Y.; Aluko, O.J. Insecticidal activity of crude extracts of three spices and commercial botanical pesticide on oriental fruit fly under laboratory conditions. *J. Basic Appl. Zool.* **2021**, *82*, 26. [CrossRef]
30. Yee, W.; Chen, L.; Wong, W. Inhibitory effect of chemical and natural anti-browning agents on polyphenol oxidase from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 3001–3007. [CrossRef] [PubMed]
31. Pinheiro, P.F.; Costa, A.V.; Alves Tde, A.; Galter, I.N.; Pinheiro, C.A.; Pereira, A.F.; Oliveira, C.M.R.; Fontes, M.M.P. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8981–8990. [CrossRef] [PubMed]

32. Ataíde, J.O. Caracterização e atividade inseticida do óleo essencial de *zingiber officinale* roscoe-zingiberaceae sobre *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae) characterization and insecticide activity of essential oil of *Zingiber officinale*. *Rev. Agronegócio Meio Ambiente* **2020**, *13*, 693–705. [[CrossRef](#)]
33. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography*, 4th ed.; Allured Business Media: Coral Gables, FL, USA, 2017.
34. Della-Lucia, T.M.C.; Vilela, E.F.; Anjos, N. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In *As Formigas Cortadeiras*; Della-Lucia, T.M.C., Ed.; Folha de Viçosa: Viçosa, Brazil, 1993; pp. 151–162.
35. Pagnocca, F.C.; da Silva, O.A.; Hebling-Beraldo, M.J.; Bueno, O.C.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bull. Entomol. Res.* **1990**, *80*, 349–352. [[CrossRef](#)]
36. Amaral, K.D.; Gandra, L.C.; de Oliveira, M.A.; de Souza, D.J.; Della Lucia, T.M.C. Effect of azadirachtin on mortality and immune response of leaf-cutting ants. *Ecotoxicology* **2019**, *28*, 1190–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Peto, R.; Peto, J. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *J. R. Stat. Soc. Ser. A* **1972**, *135*, 185–198. [[CrossRef](#)]
39. Haddi, K.; Turchen, L.M.; Viteri Jumbo, L.O.; Guedes, R.N.C.; Pereira, E.J.G.; Aguiar, R.W.S.; Oliveira, E.E. Rethinking biorational insecticides for pest management: Unintended effects and consequences. *Pest Manag. Sci.* **2020**, *76*, 2286–2293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Guedes, R.N.C.; Berenbaum, M.R.; Biondi, A.; Desneux, N. The side effects of pesticides on non-target arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **2026**, *71*, 381–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Guedes, R.N.C.; Benelli, G.; Desneux, N.; Agathokleous, E. Non-target effects of bioinsecticides: Hic sunt draconis! *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* **2025**, *46*, 100635. [[CrossRef](#)]
42. Guedes, R.N.C.; Turchen, L.M.; Wang, R.; Agathokleous, E. Bioinsecticides and non-target pest species. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* **2025**, *41*, 100570.
43. Guedes, R.N.C.; Tavella, L.; Zappalà, L.; Turchen, L.M. Beyond the usual targets: Pesticide and biopesticide interactions with natural enemies in ecological networks. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2026**, *74*, 101483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Graebin, A.; Amaral, K.D.; Lira, D.C.; Collares, L.J.; Bernardes, R.C.; Turchen, L.M.; Della-Lucia, T.M.C.; Guedes, R.N.C. Nasturtium leaf compounds, diphenyl disulfide and lylal, against *Atta sexdens* (Hymenoptera: *Formicidae*) and their symbiotic fungi. *J. Econ. Entomol.* **2024**, *117*, 1703–1711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Marinho, C.G.S.; Della Lucia, T.M.C.; Guedes, R.N.C.; Ribeiro, M.M.R.; Lima, E.R. Beta-eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomol. Exp. Appl.* **2005**, *17*, 89–93. [[CrossRef](#)]
46. Ministério da Agricultura Pe A [MAPA]. *Normas e Exigências Para Execução de Testes de Produtos Químicos Para Fins de Registro No MAPA*; MAPA: Brasília, Brazil, 1995; 1995p.
47. Karabörklü, S.; Ayvaz, A. A comprehensive review of effective essential oil components in stored-product pest management. *J. Plant Dis. Prot.* **2023**, *130*, 449–481. [[CrossRef](#)]
48. Benelli, G.; Govindarajan, M.; Rajeswary, M.; Vaseeharan, B.; Alyahya, S.A.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Maggi, F. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *148*, 781–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Feng, Y.X.; Wang, Y.; Geng, Z.F.; Zhang, D.; Almaz, B.; Du, S.S. Contact toxicity and repellent efficacy of *Valerianaceae* spp. to three stored-product insects and synergistic interactions between two major compounds camphene and bornyl acetate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *190*, 110106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bassolé, I.H.N.; Juliani, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* **2012**, *17*, 3989–4006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Chibani, S.; Boukabache, M.; Emin, M. Sustainable pest control: Assessing binary terpene combinations and pyrethroid synergy in *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) management. *J. Plant Dis. Prot.* **2026**, *133*, 54. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO 3

RESUMO

Graebin, Andressa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro, 2026. **Extratos de chaguinha (*Tropaeolum majus*) com atividade inseticida em saúva-limão (*Atta sexdens*): fracionamento biomonitorado e caracterização química.** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadoras: Karina Dias Amaral e Patrícia Fontes Pinheiro.

A importância da saúva-limão (*Atta sexdens*) como praga de sistemas agrícolas e florestais, associada à necessidade de alternativas ao controle convencional, tem ampliado o interesse por compostos de origem natural com potencial inseticida. Neste estudo, avaliou-se o potencial inseticida de extratos foliares de chaguinha (*Tropaeolum majus*) sobre operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão, por meio da triagem de extratos obtidos com diferentes solventes polares e apolares. Os extratos mais ativos foram testados em diferentes concentrações e submetidos ao fracionamento biomonitorado. Inicialmente, oito extratos foram avaliados na concentração de 100 mg mL⁻¹, dos quais foram selecionados os extratos de acetato de etila, butan-1-ol e metanol para os ensaios em diferentes concentrações. Esses extratos foram avaliados em operárias forrageadoras e jardineiras nas concentrações de 100, 50, 25, 10 e 5 mg mL⁻¹. De modo geral, a redução da concentração foi acompanhada pela diminuição da intensidade da atividade inseticida, embora os extratos tenham mantido efeito sobre as operárias mesmo nas menores concentrações avaliadas. Posteriormente, o fracionamento foi direcionado para a amostra de maior atividade, a fração 7–11 do extrato de butan-1-ol, para aprofundar a investigação química. A caracterização química dessa fração revelou uma matriz complexa, com aproximadamente 45% de ésteres, destacando-se o palmitato de etila e o linoleato de etila. Em razão dessa composição, foi preparado e avaliado um biodiesel obtido pela transesterificação alcalina de óleo de soja com etanol, como matriz enriquecida em ésteres de ácidos graxos. Esses dois constituintes também foram identificados em proporções relevantes no biodiesel utilizado no bioensaio complementar, que resultou em aproximadamente 80% de mortalidade entre operárias de *A. sexdens*. A ocorrência desses constituintes tanto na fração 7–11 quanto no biodiesel, que apresentou atividade inseticida, sugere sua possível associação com a bioatividade. Entretanto, a baixa atividade observada nas frações avaliadas a 1% não permitiu o prosseguimento da purificação até a obtenção de compostos isolados. Os resultados indicam que a chaguinha apresenta potencial como fonte de constituintes com atividade inseticida sobre

a saúva-limão, destacando os ésteres de ácidos graxos como uma classe química de interesse para investigações futuras.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras; atividade inseticida; fracionamento biomonitorado; ésteres de ácidos graxos.

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a pesquisa com produtos de origem vegetal, incluindo o isolamento e a elucidação estrutural de substâncias, tem demandado esforços extensivos (Linington et al., 2019). Nesse contexto, estratégias de isolamento guiadas por bioensaios permitem relacionar os perfis químicos de extratos e frações aos resultados obtidos nos ensaios, contribuindo para a identificação de compostos potencialmente associados aos efeitos observados (Bucar et al., 2013). Essa abordagem é particularmente relevante para a detecção de compostos presentes em baixas concentrações, mas que podem apresentar elevada atividade biológica (Kubo; Hanke, 1986). Por essa razão, o isolamento guiado por bioensaios tem sido amplamente empregado na prospecção de substâncias naturais com potencial de aplicação biológica.

A caracterização química de produtos naturais oriundos de plantas possibilita, a identificação de metabólitos secundários oriundos de plantas com propriedades inseticidas, repelentes e fungicidas, ampliando o potencial desses recursos que podem ser empregados no manejo de pragas (Teixeira et al., 2023; Defagó et al., 2017; Biavatti et al., 2002). Entre essas aplicações, a atividade inseticida apresenta interesse para o controle de formigas-cortadeiras, especialmente na busca por novos produtos de origem vegetal (Bigi et al., 2004). Esse interesse está relacionado à importância econômica dessas formigas, entre as quais a saúva-limão (*Atta sexdens*) se destaca pelos danos causados em sistemas florestais, decorrentes da remoção de material vegetal pelas colônias para o cultivo do fungo simbiote (Magalhães, 2025; Zanetti et al., 2014). O cultivo obrigatório de *Leucoagaricus gongylophorus* constitui a base nutricional das colônias e representa um dos principais fatores associados ao sucesso ecológico das formigas-cortadeiras (De Fine Licht et al., 2014; Conlon et al., 2022). Essa associação está diretamente relacionada à obtenção e à seleção dos recursos vegetais utilizados pelas colônias.

A manutenção dessa associação depende de um sistema de forrageamento no qual as formigas tendem a selecionar preferencialmente plantas com maior valor nutricional e menores concentrações de metabólitos secundários potencialmente prejudiciais ao fungo simbiote ou às próprias operárias (Saverschek et al., 2010; Silva; Vasconcelos, 2011). Como consequência

desse comportamento, a desfolha promovida por essas espécies pode ocorrer em diferentes fases do desenvolvimento das culturas (Pereira, 2021), ocasionando prejuízos em áreas agrícolas, reflorestamentos e pastagens (Buteler et al., 2019; Gandra et al., 2016). Esse cenário reforça a necessidade de estratégias compatíveis com as particularidades biológicas e ecológicas dessas formigas.

Diante dos impactos associados ao uso de pesticidas sintéticos, a utilização de produtos de origem vegetal representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis ao controle de pragas em sistemas agrícolas e florestais (Brzozowski; Mazourek, 2023; Meneghetti et al., 2015). Essa perspectiva está diretamente relacionada aos mecanismos naturais de defesa das plantas, que respondem à herbivoria por meio de sistemas complexos e dinâmicos, nos quais a defesa induzida constitui um dos principais mecanismos de proteção contra insetos-praga (Tlak Gajger; Dar, 2021). A defesa química constitui uma importante dimensão dessa resposta vegetal.

Dessa forma, os produtos naturais de origem vegetal constituem importantes fontes de compostos biologicamente ativos (Jacob, 2009; Silva Melo et al., 2024) e podem integrar estratégias de controle baseadas em biopesticidas, que abrangem agentes de controle de pragas de origem natural, provenientes de plantas, animais e microrganismos (Godfray et al., 2010; Jhala et al., 2020). Algumas espécies vegetais destacam-se, portanto, pela diversidade de compostos bioativos e pelo potencial de suas aplicações no controle de pragas.

Nesse contexto, a chaguinha *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) destaca-se por sua ampla distribuição e importância alimentar, medicinal e ornamental (Lourenço et al., 2014; Silva et al., 2011). A espécie apresenta ampla diversidade fitoquímica, incluindo ácidos graxos, compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides, filoxantobilinas, vitamina C e glucosinolatos, destacando-se a glucotropaeolina entre estes últimos (Frei et al., 2024; Česlová et al., 2023; Havlíková et al., 2026). Essa diversidade química contribui para o interesse da espécie como fonte de compostos com potencial de atividade biológica.

O potencial da chaguinha no contexto das interações com formigas-cortadeiras vem sendo investigado ao longo dos últimos anos, com estudos voltados à avaliação da atividade de seus extratos, de efeitos sobre o comportamento e a organização social das colônias e, mais recentemente, à investigação de possíveis compostos responsáveis por sua atividade (Ribeiro et al., 2008; Ribeiro, 2011; Gandra, 2018; Graebin et al., 2024). Esses estudos reforçam o potencial deste vegetal como fonte de substâncias bioativas, mas também evidenciam a necessidade de esclarecer a relação entre sua composição química e a atividade inseticida sobre a saúva-limão, espécie de importância econômica em cultivos agrícolas e florestas implantadas

(Della Lucia et al. 2014; Magalhães, 2025; Zanetti et al., 2014). Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial inseticida de extratos de chaguinha (*Tropaeolum majus*) sobre operárias forrageadoras e jardineiras de de saúva-limão *Atta sexdens*, por meio da triagem de extratos obtidos com diferentes solventes, da avaliação dos extratos mais ativos em diferentes concentrações e do fracionamento biomonitorado, buscando relacionar a atividade inseticida ao perfil químico dos extratos e das frações obtidas. Para isso, hipotetizou-se que: (i) os diferentes extratos de chaguinha apresentariam diferentes níveis de atividade inseticida sobre operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão; (ii) os extratos mais ativos manteriam atividade inseticida em concentrações inferiores às empregadas na triagem inicial, ainda que com redução da intensidade do efeito tóxico; e (iii) o fracionamento dos extratos mais ativos permitiria direcionar a investigação química para a identificação de constituintes associados à atividade inseticida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A chaguinha (*Tropaeolum majus* L.) (Tropaeolaceae) foi cultivada na Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A identificação botânica foi realizada por especialista, e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa sob o número VIC56925 (**figura 1**).

Figura 1 - Exsicata de *Tropaeolum majus* L. utilizada no estudo, depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC), sob o número VIC56925.



Foram utilizadas folhas de chaguinha (*T. majus*), coletadas e posteriormente submetidas à secagem em estufa com circulação de ar, à temperatura de 30–35 °C durante 48 horas (Maldonado et al., 2024). Após a secagem, o material vegetal foi triturado até a obtenção de pó homogêneo, adequado aos procedimentos de extração.

2.2 Obtenção dos extratos

Para a obtenção de extratos com diferentes características de polaridade, o material vegetal foi submetido a duas estratégias de extração: maceração isolada e extração sólido-líquido sequencial. As extrações foram realizadas utilizando-se a proporção de 1:10 (m/v) entre o material vegetal e o solvente extrator, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Alíquotas de 100 g do material vegetal pulverizado foram submetidas separadamente à maceração em água, etanol e metanol. Cada sistema permaneceu em maceração durante 72 horas (Vrca et al., 2025), à temperatura ambiente e sob agitação constante.

Uma segunda alíquota de 100 g do material vegetal pulverizado foi submetida à extração sólido-líquido sequencial, utilizando diferentes solventes em ordem crescente de polaridade. Inicialmente, o material foi submetido à maceração com hexano durante 72 horas. Após esse período, a mistura foi filtrada e o resíduo vegetal foi mantido à temperatura ambiente até a evaporação do solvente residual. O resíduo foi então submetido sucessivamente à maceração com diclorometano, acetato de etila, butan-1-ol e metanol, mantendo-se o mesmo período de extração de 72 horas em cada etapa. Após cada período, a mistura foi filtrada e o resíduo vegetal foi utilizado na etapa subsequente.

Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, com a temperatura de evaporação ajustada de acordo com o solvente utilizado, visando minimizar possíveis alterações dos constituintes químicos. A concentração de extratos vegetais por evaporação sob pressão reduzida é amplamente empregada para a remoção do solvente e a obtenção de extratos concentrados, especialmente por permitir a evaporação em temperaturas inferiores ao ponto de ebulição dos solventes à pressão atmosférica (Zhang et al., 2018). Os extratos concentrados foram transferidos para recipientes previamente tarados e mantidos até a completa remoção do solvente residual. Posteriormente, foram pesados para determinação do rendimento de extração e armazenados em frascos de vidro âmbar, protegidos da luz e da umidade, até a realização dos bioensaios.

2.3 Obtenção e manutenção das colônias de saúva-limão

As colônias de saúva-limão utilizadas nos bioensaios foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, entre outubro de 2024 e março de 2025. Após a coleta, foram

transferidas para o Insetário da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidas sob condições controladas, seguindo adaptações da metodologia descrita por Della Lucia et al. (1993a). As colônias foram mantidas à temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h claro:12 h escuro. Durante o período de manutenção, foram fornecidas diariamente folhas frescas de acalifa (*Acalypha wilkesiana* Mull. Arg.) como substrato para manutenção do jardim de fungo, além de água.

Foram utilizadas colônias com aproximadamente 1 L de jardim de fungo, atividade normal de forrageamento, jardim íntegro e ausência aparente de contaminação, doenças ou declínio fisiológico. Antes da realização dos bioensaios, o fornecimento de folhas de acalifa foi interrompido, conforme adaptação da metodologia de Nagamoto et al. (2009), visando reduzir possíveis efeitos de condicionamento alimentar e padronizar as condições dos ensaios.

2.4 Seleção das operárias

Foram utilizadas operárias das castas forrageadora e jardineira de saúva-limão de cinco colônias. Os indivíduos foram coletados imediatamente antes da instalação de cada experimento. Foram selecionadas operárias visualmente íntegras, ativas e sem danos aparentes. Indivíduos lesionados, debilitados ou que apresentassem comportamento anormal foram descartados. A utilização das duas castas permitiu avaliar a resposta de indivíduos com diferentes funções na organização social da colônia.

2.5 Triagem biológica dos extratos

A atividade inseticida dos extratos de chaguinha foi inicialmente avaliada utilizando em concentração única de 100 mg mL^{-1} (Amaral et al., 2019). Foram avaliados os oito extratos obtidos pelas estratégias de extração isolada e sólido-líquido sequencial. Os experimentos foram conduzidos separadamente para operárias forrageadoras e jardineiras. Cada bioensaio foi constituído por cinco repetições, sendo cada unidade experimental formada por 10 operárias acondicionadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo água e solução de mel na proporção de 1:1. Os extratos foram aplicados topicamente sobre o tórax das operárias com o auxílio de uma micropipeta automática. Para as operárias forrageadoras foi utilizado volume de $1 \mu\text{L}$, enquanto para as jardineiras foi utilizado volume de $0,5 \mu\text{L}$ (Graebin et al., 2024). A definição desses volumes decorreu de testes prévios e da aferição da massa corporal, que indicaram que as formigas jardineiras apresentavam cerca de metade do peso das forrageiras. Assim, a aplicação de $0,5 \mu\text{L}$ em jardineiras e $1 \mu\text{L}$ em forrageiras garantiu uma dosagem proporcional por unidade de massa, evitando tanto a mortalidade associada ao solvente quanto o bloqueio de espiráculos ou apêndices. Os respectivos grupos-controle receberam apenas o

solvente utilizado na preparação das soluções. A mortalidade foi avaliada diariamente durante sete dias, período que permitiu acompanhar a resposta das operárias ao tratamento sob condições laboratoriais, nas quais os indivíduos foram mantidos isoladamente e fora do ambiente social e do jardim de fungo da colônia. Os resultados dessa etapa foram utilizados para selecionar os extratos mais promissores para os ensaios de concentração–resposta.

2.6 Ensaios de concentração–resposta

Os três extratos previamente selecionados na triagem inicial realizada na concentração de 100 mg mL⁻¹, foram submetidos a ensaios em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10 e 5 mg mL⁻¹), com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade inseticida após a redução da concentração. Os experimentos foram conduzidos separadamente para operárias forrageadoras e jardineiras, mantendo-se o delineamento utilizado na triagem inicial, com cinco repetições e dez indivíduos por repetição. As soluções foram aplicadas topicamente sobre o tórax das operárias, utilizando-se os volumes correspondentes a cada casta. A sobrevivência foi avaliada diariamente durante sete dias. Os extratos de acetato de etila, butan-1-ol e metanol, previamente selecionados na triagem inicial, foram posteriormente utilizados nas etapas de prospecção biomonitorada, incluindo fracionamento e caracterização química.

2.7 Fracionamento biomonitorado

Os extratos selecionados foram submetidos ao fracionamento biomonitorado, com o objetivo de acompanhar a distribuição da atividade inseticida durante o processo de separação química (Bucar et al., 2013). O fracionamento foi realizado por cromatografia líquida em coluna clássica, utilizando 10 g de cada extrato (acetato de etila sequencial, metanol não sequencial e butan-1-ol sequencial), aproximadamente 500 g de sílica-gel como fase estacionária. O extrato foi previamente solubilizado em diclorometano ou acetato de etila e aplicado sobre a coluna. A eluição foi realizada por meio de um gradiente de polaridade composto por misturas de hexano:acetato de etila (1:1), procedimento amplamente empregado na separação de constituintes de produtos naturais (Zhang et al., 2018). O gradiente iniciou-se na proporção de 3:1 (v/v; 600:200 mL), seguido por 1:1 (100:100 mL) e, posteriormente, 1:3 (200:600 mL). Durante o procedimento, o leito cromatográfico foi mantido constantemente imerso em solvente para preservar sua integridade física. As frações foram coletadas sequencialmente e devidamente identificadas de acordo com a ordem de eluição.

As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica, utilizando os mesmos sistemas de solventes empregados na eluição da coluna. As placas foram inicialmente avaliadas sob radiação ultravioleta (UV) e posteriormente

submetidas à revelação química por aspersão com solução de permanganato de potássio (KMnO_4), seguida de aquecimento, conforme procedimentos empregados para a visualização de constituintes em análises cromatográficas de produtos naturais (Bucar et al., 2013; Still et al., 1978). As frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, considerando principalmente o número de manchas e os valores de R_f , foram agrupadas (Bucar et al., 2013; Zhang et al., 2018). Após o agrupamento, os solventes foram removidos sob pressão reduzida utilizando evaporador rotativo (Zhang et al., 2018).

2.8 Bioensaios das frações

Todas as frações obtidas a partir dos três extratos selecionados foram avaliadas quanto à atividade inseticida sobre operárias jardineiras de saúva-limão. Os bioensaios foram realizados utilizando a concentração de 1 mg mL^{-1} , com cinco repetições de dez operárias por tratamento. Cada operária jardineira recebeu $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução da fração aplicada topicamente sobre o tórax (Graebin et al., 2024). As operárias foram mantidas em placas de Petri contendo água e solução de mel (1:1), nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente. A mortalidade foi registrada diariamente durante sete dias. Os resultados foram utilizados para acompanhar a distribuição da atividade biológica durante o fracionamento biomonitorado e selecionar as frações de interesse para caracterização química.

2.9 Caracterização química das frações

As frações selecionadas foram submetidas à caracterização química por técnicas cromatográficas e espectroscópicas, incluindo FTIR, CG-EM e RMN. Os resultados das análises químicas foram integrados aos dados dos bioensaios, permitindo investigar a associação entre a composição química das frações e a atividade inseticida observada. As frações foram submetidas à análise por FTIR para identificação dos principais grupos funcionais presentes. Os espectros obtidos foram utilizados como informação complementar às análises cromatográficas e espectroscópicas subsequentes, contribuindo para a caracterização química das frações. As frações foram analisadas por CG-EM com o objetivo de separar, detectar e auxiliar na identificação dos constituintes químicos (Yang et al., 2025). Para as análises, alíquotas de aproximadamente 1–3 mg das amostras foram solubilizadas em diclorometano e transferidas para frascos apropriados. A identificação preliminar dos constituintes foi realizada mediante comparação dos espectros de massas obtidos com bibliotecas espectrais disponíveis e, quando possível, com índices de retenção e dados descritos na literatura científica especializada (Yang et al., 2025; NIST, 2026). As frações também foram

analisadas por RMN como ferramenta complementar para caracterização estrutural dos constituintes (Huang et al., 2024).

Para as análises de RMN, foram utilizadas aproximadamente 20–50 mg das amostras. As amostras foram solubilizadas em aproximadamente 700 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou outro solvente deuterado adequado e transferidas para tubos de RMN devidamente identificados. O emprego de solventes deuterados e de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C constitui procedimento amplamente utilizado na caracterização estrutural de produtos naturais (Nazarski, 2023; Huang et al., 2024). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , combinados aos dados de espectrometria de massas e às informações disponíveis na literatura, foram utilizados em conjunto com os dados de espectrometria de massas e informações da literatura para auxiliar na caracterização estrutural dos constituintes (Huang et al., 2024; Robien, 2017). Os compostos que não apresentaram quantidade suficiente para realização de bioensaios individuais foram identificados com base na comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , de espectrometria de massas e da literatura disponível (Huang et al., 2024; Marcarino et al., 2022).

2.10 Relação entre composição química e atividade inseticida

Os resultados obtidos nos bioensaios foram comparados aos perfis químicos das respectivas frações. A caracterização da fração 7–11 revelou uma composição complexa, constituída principalmente por ácidos graxos, ésteres, álcoois e terpenos, sendo os ésteres a classe mais representativa, correspondendo a 44,53% da composição. Entre os compostos identificados nessa classe, destacaram-se o palmitato de etila, o linoleato de etila, o linolenato de etila, o hexadecanoato de butila e o octadeca-9,12,15-trienoato de butila. A elevada representação dos ésteres na fração 7–11 levantou a hipótese de que essa classe poderia estar associada à atividade inseticida observada. Para avaliar essa possibilidade, foi utilizado o biodiesel como uma matriz enriquecida em ésteres de ácidos graxos, permitindo verificar se uma preparação com elevada representação dessa classe também apresentaria atividade inseticida.

2.11 Produção e caracterização do biodiesel

O biodiesel foi obtido por transesterificação alcalina do óleo de soja utilizando etanol e metóxido de potássio como catalisador. Inicialmente, 50 mL de óleo de soja comercial foram transferidos para um balão de fundo redondo de 250 mL e aquecidos a 60 °C, sob agitação magnética. Em seguida, foi preparada uma solução catalítica contendo etanol e metóxido de

potássio, empregando razão molar etanol:óleo de 6:1 e 1,0% (m/m) de catalisador em relação à massa do óleo.

A solução etanólica de metóxido de potássio foi adicionada ao óleo previamente aquecido, mantendo-se a mistura sob agitação constante a 60 °C durante 1 hora. Ao término da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação e mantida em repouso por aproximadamente 12 horas, permitindo a separação das fases. A fase inferior, correspondente ao glicerol, foi descartada, enquanto a fase superior, contendo o biodiesel, foi lavada sucessivamente com água destilada morna até atingir pH neutro, visando à remoção de resíduos de catalisador, etanol e glicerol. Posteriormente, o biodiesel foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e armazenado em frascos de vidro âmbar, protegidos da luz, até a realização das análises químicas e dos bioensaios. A metodologia foi baseada no procedimento descrito por Celante et al. (2018) quanto ao emprego do metóxido de potássio como catalisador na produção de biodiesel.

A composição química do biodiesel foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), visando identificar os ésteres etílicos de ácidos graxos presentes na amostra. A identificação dos constituintes foi realizada mediante comparação dos espectros de massas obtidos com bibliotecas espectrais e índices de retenção descritos na literatura especializada.

2.12 Avaliação da atividade inseticida do biodiesel

A utilização do biodiesel constituiu uma prova de conceito complementar no estudo, realizada após a caracterização química indicar que aproximadamente 45% da fração bioativa (fração 7–11) era constituída por ésteres de ácidos graxos. Diante da impossibilidade de isolar todos os compostos puros em quantidade suficiente para bioensaios individuais, a escolha do biodiesel justificou-se por sua característica de matriz-modelo rica e padronizada em ésteres graxos (>98%), compartilhando constituintes majoritários (como palmitato de etila e linoleato de etila) com a fração ativa da planta. O objetivo foi investigar experimentalmente se uma matriz concentrada nessa classe química apresentaria atividade inseticida sobre saúva-limão, fornecendo evidências sobre a relação entre a função química éster e a bioatividade.

O biodiesel foi avaliado por aplicação tópica sobre operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão, seguindo o mesmo princípio experimental empregado nos demais bioensaios. As operárias foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, juntamente com os respectivos grupos-controle. As aplicações foram realizadas diretamente sobre o tórax

utilizando micropipeta automática, respeitando os volumes estabelecidos para cada casta. Após o tratamento, os insetos foram mantidos nas mesmas condições de criação descritas anteriormente e a sobrevivência foi monitorada diariamente por 7 dias. Foram consideradas mortas as operárias que não apresentaram qualquer movimento após estímulo mecânico.

2.13 Análises estatísticas

Os dados de sobrevivência das operárias foram submetidos à análise de sobrevivência pelo método de Kaplan–Meier (Kaplan; Meier, 1958), para obtenção das curvas de sobrevivência. As curvas foram comparadas pelo teste de log-rank (Peto; Peto, 1972), adotando-se nível de significância de 5%. A normalidade e a homogeneidade dos resíduos foram verificadas utilizando o pacote performance. Quando necessária, a sobredispersão dos modelos foi ajustada e as diferenças entre tratamentos foram avaliadas por contrastes, considerando $P < 0,05$. As análises foram realizadas no software R, versão 4.2.1, utilizando a interface RStudio, versão 2022.2.3 (R Core Team, 2022)

3. RESULTADOS

3.1 Atividade inseticida dos extratos de *Tropaeolum majus*

A atividade inseticida dos extratos de chaguinha foi inicialmente avaliada sobre operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão, utilizando diferentes sistemas de extração, na concentração de 100 mg mL⁻¹. As curvas de sobrevivência evidenciaram diferenças na resposta das operárias aos extratos ao longo do período de avaliação, tanto para os extratos preparados em Tween (**Figura 2A-2B**) quanto para aqueles preparados em acetona (**Figura 3A-3B**). Entre os tratamentos, os extratos obtidos com acetato de etila, butan-1-ol e metanol promoveram as maiores reduções na sobrevivência das operárias e, por apresentarem maior atividade inseticida na triagem inicial, foram selecionados para os ensaios subsequentes de concentração–resposta. A resposta observada também variou entre as castas, com diferentes padrões de sobrevivência entre operárias forrageadoras e jardineiras ao longo do período experimental.

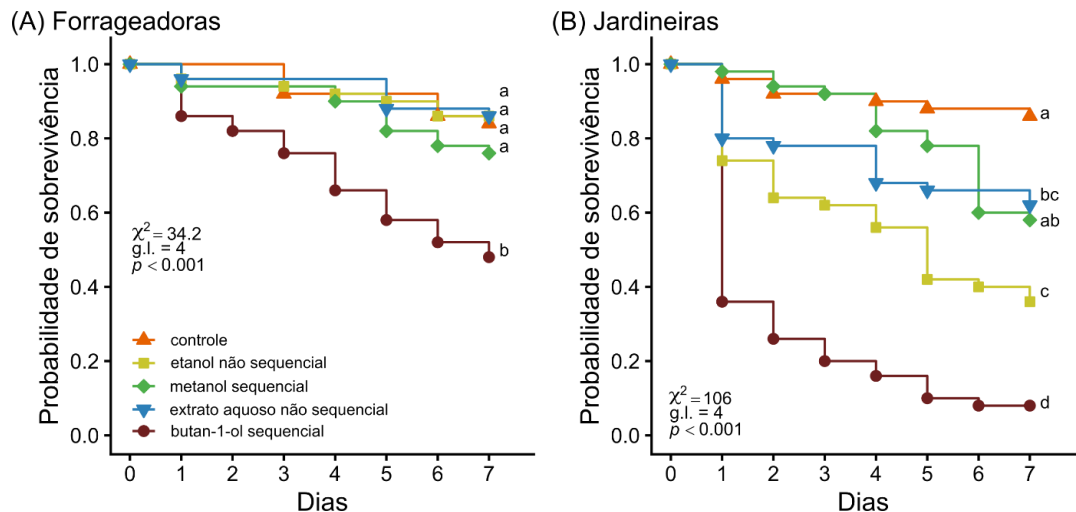


Figura 2 - Curvas de sobrevivência de operárias forrageadoras (A) e jardineiras (B) de saúva-limão (*Atta sexdens*) após aplicação tópica dos extratos de chaguinha (*Tropaeolum majus*), preparados em Tween, na concentração de 100 mg mL^{-1} , durante o período de avaliação. Curvas seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de log-rank.

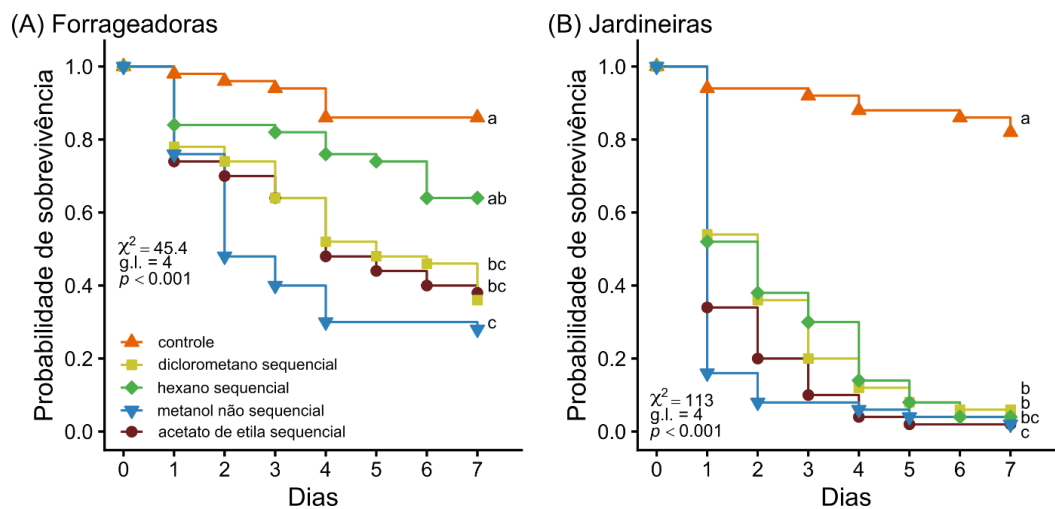


Figura 3 - Curvas de sobrevivência de operárias forrageadoras (A) e jardineiras (B) de saúva-limão (*Atta sexdens*) após aplicação tópica dos extratos de chaguinha (*Tropaeolum majus*), preparados em acetona, na concentração de 100 mg mL^{-1} , durante o período de avaliação. Curvas seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de log-rank.

3.2 Efeito da concentração sobre a atividade inseticida

Após a triagem inicial dos extratos na concentração de 100 mg mL^{-1} , os extratos de acetato de etila, metanol e butan-1-ol, que apresentaram maior atividade inseticida, foram avaliados nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL^{-1} . Os ensaios foram conduzidos separadamente com operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão, e a sobrevivência foi acompanhada durante sete dias. A resposta à concentração diferiu entre os extratos e entre as castas avaliadas. Para os extratos de acetato de etila e butan-1-ol, foram observadas diferenças

significativas na sobrevivência das operárias entre as concentrações testadas, enquanto, para o extrato de metanol, esse efeito foi observado apenas entre as jardineiras (Figuras 4–6).

3.2.1 Extrato de acetato de etila

O extrato de acetato de etila reduziu significativamente a sobrevivência das operárias forrageadoras em função da concentração ($\chi^2 = 123,0$; gl = 5; $P < 0,001$). Ao final de sete dias, a sobrevivência foi de aproximadamente 94% no controle e de 52, 75, 77, 8 e 6% nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente. As maiores reduções na sobrevivência ocorreram nas concentrações de 50 e 100 mg mL⁻¹, que apresentaram os menores valores ao final do período experimental (Figura 4A). Entre as jardineiras, também foi observada diferença significativa entre as concentrações ($\chi^2 = 95,5$; gl = 5; $P < 0,001$), com sobrevivência de aproximadamente 86% no controle e redução progressiva com o aumento da concentração, atingindo cerca de 40, 34, 30, 12 e 10% nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 4B).

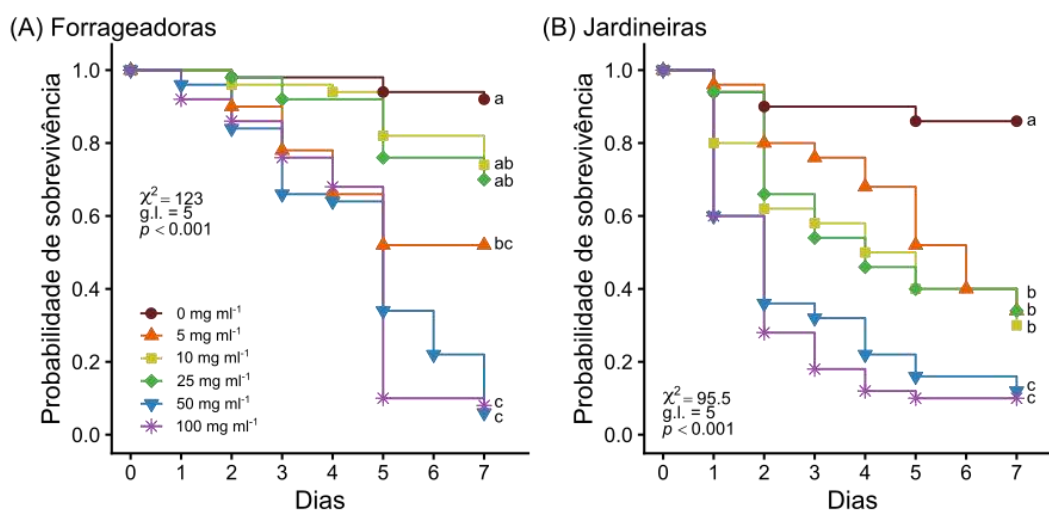


Figura 4 - Curvas de sobrevivência de operárias forrageadoras (A) e jardineiras (B) de saúva-limão (*Atta sexdens*) após aplicação tópica do extrato de acetato de etila de chaguinha (*Tropaeolum majus*), nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, durante o período de avaliação. Curvas seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de log-rank.

3.2.2 Extrato de metanol

Para o extrato de metanol, não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência das operárias forrageadoras entre as concentrações avaliadas ($\chi^2 = 7,6$; gl = 5; $P = 0,2$). Ao final de sete dias, a sobrevivência permaneceu elevada, variando aproximadamente entre 68 e 90% entre os tratamentos (Figura 5A). Em contraste, as jardineiras apresentaram diferença significativa entre as concentrações ($\chi^2 = 59,7$; gl = 5; $P < 0,001$), com redução da

sobrevivência em relação ao controle. Ao final de sete dias, a sobrevivência foi de aproximadamente 90% no controle e de 48, 34, 29, 27 e 34% nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 5B).

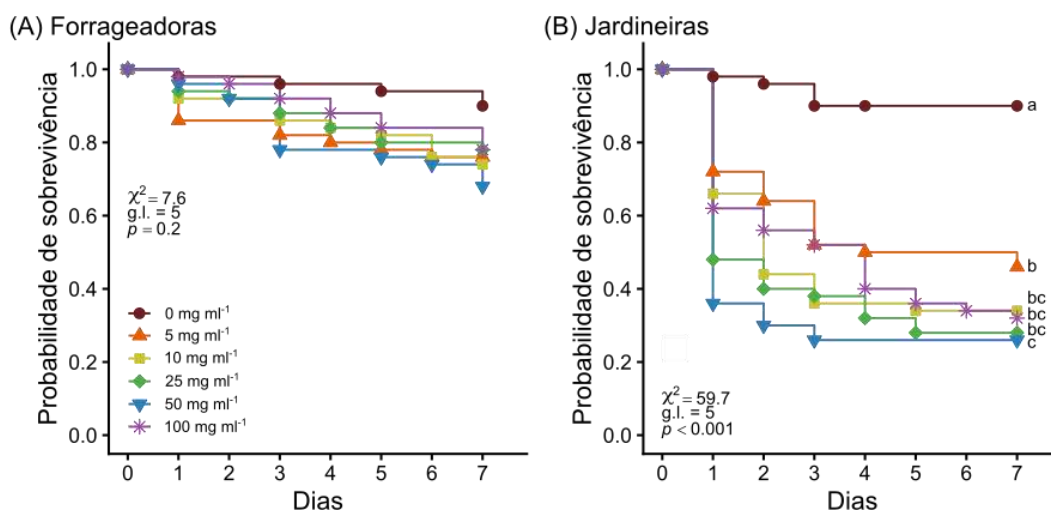


Figura 5 - Curvas de sobrevivência de operárias forrageadoras (A) e jardineiras (B) de saúva-limão (*Atta sexdens*) após aplicação tópica do extrato de metanol de chaguinha (*Tropaeolum majus*), nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, durante o período de avaliação. Curvas seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de log-rank.

3.2.3 Extrato de butan-1-ol

O extrato de butan-1-ol apresentou efeito significativo da concentração sobre a sobrevivência das operárias forrageadoras ($\chi^2 = 50,2$; gl = 5; $P < 0,001$). Ao final de sete dias, a sobrevivência foi de aproximadamente 92% no controle e de 63, 78, 35, 36 e 44% nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 6A). Entre as jardineiras, também foi observada diferença significativa entre as concentrações ($\chi^2 = 63,6$; gl = 5; $P < 0,001$), com sobrevivência de aproximadamente 90% no controle e de 29, 20, 31, 14 e 33% nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 6B).

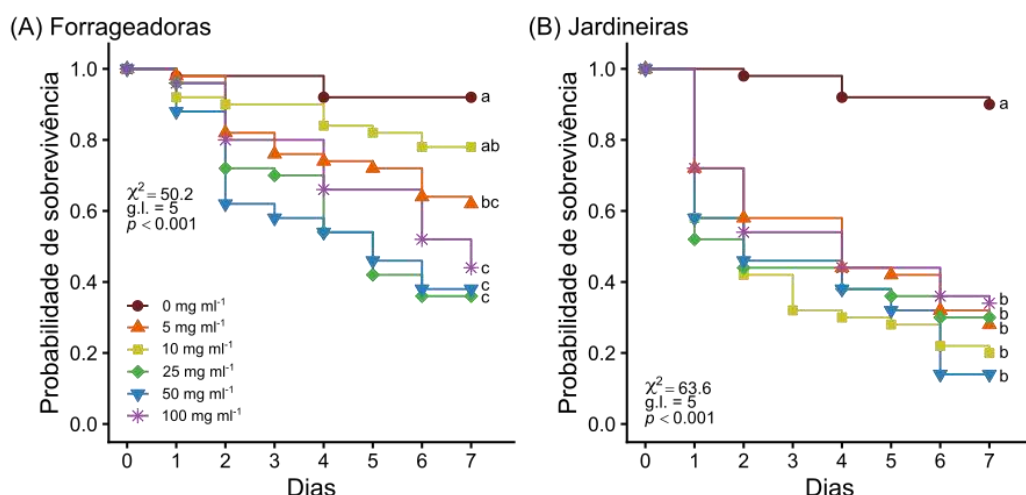


Figura 6 - Curvas de sobrevivência de operárias forrageadoras (A) e jardineiras (B) de saúva-limão (*Atta sexdens*) após aplicação tópica do extrato de butan-1-ol de chaguinha (*Tropaeolum majus*), nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 mg mL⁻¹, durante o período de avaliação. Curvas seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de log-rank.

3.3 Fracionamento biomonitorado e atividade inseticida das frações

Os extratos de acetato de etila, butan-1-ol e metanol, selecionados nas etapas anteriores em razão da atividade inseticida apresentada, foram submetidos ao fracionamento cromatográfico. A separação resultou na obtenção de diferentes grupos de frações, posteriormente agrupados de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos observados por cromatografia em camada delgada. Os grupos de frações obtidos foram submetidos à avaliação da atividade inseticida sobre operárias jardineiras de saúva-limão (*Atta sexdens*), permitindo acompanhar a distribuição da atividade biológica após a separação dos constituintes (Figura 7).

A atividade inseticida variou entre os grupos de frações avaliados, com diferentes padrões de sobrevivência das operárias ao longo do período experimental. Algumas frações promoveram redução da sobrevivência, enquanto outras apresentaram respostas próximas às observadas no controle. Dessa forma, o fracionamento permitiu identificar grupos de frações com diferentes respostas biológicas, os quais foram utilizados para direcionar as etapas subsequentes de caracterização química.

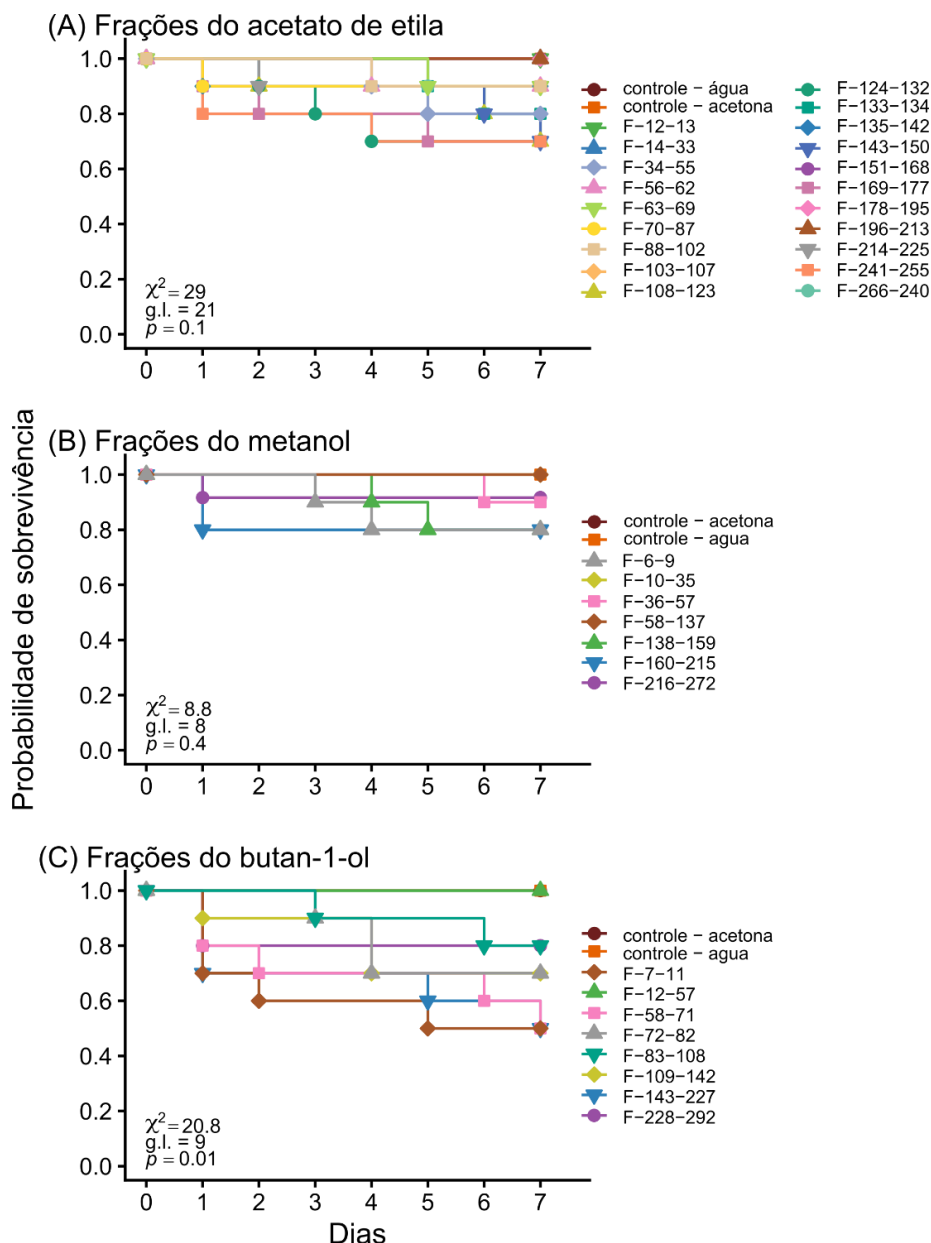


Figura 7 - Fracionamento biomonitorado dos extratos de chaguinha (*Tropaeolum majus*) selecionados com base na atividade inseticida, apresentando os grupos de frações obtidos por separação cromatográfica e os respectivos resultados dos bioensaios de sobrevivência de operárias jardineiras de saúva-limão (*Atta sexdens*).

A fração 7-11, obtida a partir do extrato de butan-1-ol de chaguinha e selecionada com base na atividade inseticida observada nos bioensaios, apresentou um perfil químico constituído por diferentes classes de compostos. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicaram a presença de cadeias alifáticas longas, com sinais compatíveis com insaturações e grupos funcionais oxigenados. Os dados espectroscópicos também foram compatíveis com a presença de constituintes da classe dos ésteres graxos. Em conjunto, os resultados indicaram que a fração 7-11 era constituída por uma mistura de diferentes constituintes químicos, e não por um único composto.

A caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) permitiu a caracterização de diferentes constituintes presentes na fração 7–11 (**Tabela 1**). Entre os constituintes caracterizados, o ácido linolênico apresentou a maior área relativa individual (20,64%), seguido pelo octadeca-9,12,15-trienoato de butila (13,10%), pelo ácido palmítico (12,37%) e pelo octacosan-1-ol (11,81%). Também foram caracterizados diferentes constituintes pertencentes à classe dos ésteres, incluindo palmitato de etila, linolenato de etila, hexadecanoato de butila, citrato de tributila, linoleato de etila e octadeca-9,12,15-trienoato de butila. Considerando as áreas relativas desses constituintes, a classe dos ésteres correspondeu a 44,53% da composição da fração 7–11, sendo representada por diferentes tipos de ésteres. Dessa forma, os ésteres constituíram uma das classes químicas mais representativas da fração selecionada para caracterização (**Figura 8; Tabela 1**).

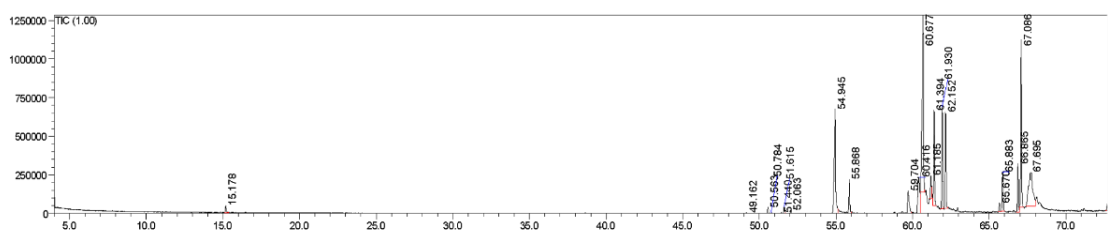


Figura 8 - Cromatograma de íons totais da fração 7–11 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*, evidenciando os principais constituintes químicos detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Tabela 1 - Constituintes químicos identificados na fração 7–11 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*, respectivos tempos de retenção e áreas relativas.

TR (min.)	Composto identificado	% Área
15,18	Limoneno	0,50
50,56	Isobutanoato de citronelila	0,37
50,78	2-metilpentanal*	0,05
51,44	Histamina	0,04
52,06	Propanoato de citronelila	0,18
54,95	Ácido palmítico	12,37
55,87	Palmitato de etila	2,52
59,70	Fitol	2,99
60,42	Ácido linoleico	5,77
60,68	Ácido linolênico	20,64
61,19	2-cis,cis-9,12-Octadecadieniletanol	0,16
61,39	Linolenato de etila	7,46
61,93	Hexadecanoato de butila	7,47
62,15	Citrato de tributila	7,14
65,67	Octadec-9-ino	0,58
65,88	Linolenato de etila	2,93
66,87	Linoleato de etila	3,91
67,09	Octadeca-9,12,15-trienoato de butila	13,10
67,70	Octacosan-1-ol	11,81
	Total	100,00

TR, tempo de retenção; % Área, porcentagem da área relativa do composto no cromatograma*. Constituinte presente em nim (*Azadirachta indica*).

3.4 Atividade inseticida do biodiesel

A elevada representação da classe dos ésteres na fração 7–11, correspondente a 44,53% da composição, motivou a realização de um bioensaio complementar utilizando biodiesel obtido a partir de óleo de soja e etanol, como matriz enriquecida nessa classe química. As curvas de sobrevivência evidenciaram diferenças entre os tratamentos ao longo do período de avaliação. O biodiesel apresentou o maior efeito sobre a sobrevivência das operárias jardineiras, especialmente na concentração de 1%. A sobrevivência diminuiu progressivamente ao longo dos sete dias, atingindo aproximadamente 20% ao final do experimento, o que corresponde a cerca de 80% de mortalidade. Os demais tratamentos apresentaram diferentes padrões de sobrevivência, variando entre reduções intermediárias e maior manutenção da sobrevivência ao longo do período de avaliação (**Figura 9**).

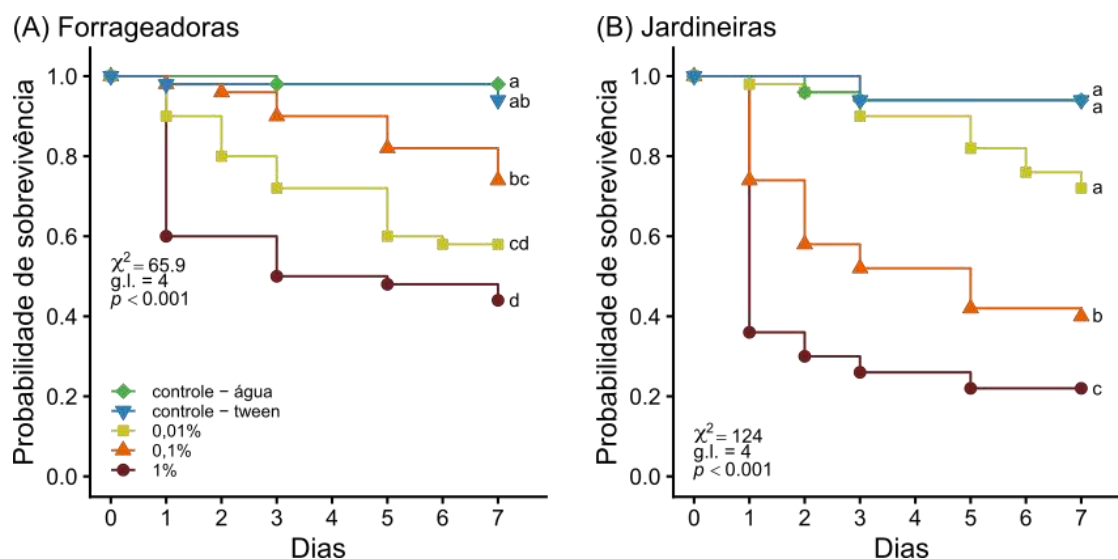


Figura 9 - Curvas de sobrevivência de operárias de saúva-limão (*Atta sexdens*) submetidas à aplicação tópica de biodiesel e aos respectivos tratamentos-controle durante sete dias de avaliação. Curvas seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de log-rank.

A caracterização química do biodiesel foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), permitindo caracterizar os principais constituintes presentes na matriz e determinar suas respectivas áreas relativas no cromatograma (Tabela 2). A análise revelou predominância de ésteres de ácidos graxos, com destaque para o linoleato de etila (43,95%), seguido pelo palmitato de etila (12,34%), estearato de etila (8,41%) e oleato de etila (6,49%). Também foram caracterizados o octadecanoato de etila (3,80%) e o icosanoato de etila (1,49%). Entre os constituintes identificados, o linoleato de etila apresentou a maior área relativa individual, correspondendo a 43,95% da composição da amostra.

Além dos ésteres etílicos de ácidos graxos, foi caracterizado um constituinte com área relativa de 21,79%, identificado como (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etila. Um constituinte adicional, correspondente a 1,73% da área relativa, foi detectado no tempo de retenção de 16,97 min, porém não foi identificado (NI). De forma geral, os constituintes caracterizados foram predominantemente ésteres derivados de ácidos graxos, com o linoleato de etila representando a maior área relativa individual no cromatograma (Tabela 2).

Tabela 2 - Constituintes químicos caracterizados no biodiesel sintetizado a partir de óleo de soja e etanol, respectivos tempos de retenção e áreas relativas.

TR (min.)	Composto identificado	% Área
13,11	Palmitato de etila	12,34
14,14	Linoleato de etila	43,95
14,16	Oleato de etila	6,49
14,20	Estearato de etila	8,41
14,99	Icosanoato de etila	1,49
15,90	Octadecanoato de etila	3,80
16,67	(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-dienoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etila	21,79
16,97	NI	1,73
	Total	100,00

TR, tempo de retenção; % Área, porcentagem da área relativa do constituinte no cromatograma.

3.5 Comparação entre a fração de chaguinha e o biodiesel

A comparação dos perfis químicos revelou que a fração 7–11 e o biodiesel apresentaram constituintes pertencentes à mesma classe química, embora com diferenças na composição e nas proporções relativas dos ésteres identificados. Na fração 7–11, foram caracterizados palmitato de etila (2,52%), linolenato de etila (7,46% e 2,93%), hexadecanoato de butila (7,47%), citrato de tributila (7,14%), linoleato de etila (3,91%) e octadeca-9,12,15-trienoato de butila (13,10%), correspondendo, em conjunto, a 44,53% da composição da fração.

No biodiesel, foram caracterizados palmitato de etila (12,34%), linoleato de etila (43,95%), oleato de etila (6,49%), estearato de etila (8,41%), icosanoato de etila (1,49%) e octadecanoato de etila (3,80%), além do constituinte identificado como (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etila (21,79%). Esses constituintes corresponderam, em conjunto, a 98,27% da composição da amostra, enquanto 1,73% correspondeu a um constituinte não identificado (NI).

Entre as duas matrizes, palmitato de etila e linoleato de etila foram os únicos ésteres identificados em comum. O palmitato de etila apresentou área relativa de 2,52% na fração 7–11 e 12,34% no biodiesel, enquanto o linoleato de etila correspondeu a 3,91% e 43,95%, respectivamente. Apesar da presença desses constituintes comuns, as duas matrizes apresentaram perfis químicos distintos, caracterizados pela ocorrência de constituintes exclusivos e por diferentes proporções relativas. Ambas as matrizes apresentaram atividade inseticida sobre saúva-limão, porém os resultados não permitem atribuir o efeito a um éster específico, uma vez que os constituintes não foram isolados e avaliados individualmente. A

atividade observada pode, portanto, estar associada à composição química das matrizes e à ação conjunta de seus constituintes.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo forneceram suporte às hipóteses propostas em diferentes níveis. A Hipótese I, segundo a qual os diferentes extratos de chaguinha apresentariam diferentes níveis de atividade inseticida sobre operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão, foi sustentada pelos resultados, que evidenciaram diferenças na resposta biológica entre os sistemas de extração avaliados. Embora o procedimento de extração tenha sido mantido constante, a utilização de solventes com diferentes características de polaridade pode favorecer a extração diferencial dos constituintes presentes na matriz vegetal, uma vez que os fitoquímicos apresentam diferentes afinidades por diferentes solventes (Lefebvre et al., 2021; Kumar et al., 2023). Na chaguinha, a composição química dos extratos também pode variar conforme o solvente empregado, favorecendo a obtenção de diferentes constituintes (Bazylko et al., 2013; Česlová et al., 2023; Frei et al., 2024; Lourenço et al., 2012). Dessa forma, as diferenças de atividade observadas no presente estudo podem estar associadas à composição química diferencial dos extratos, e não exclusivamente à polaridade dos solventes. Esses resultados dão suporte à Hipótese I, embora não permitam atribuir as diferenças observadas a um único fator, dada a complexidade química dos extratos e as possíveis interações entre seus constituintes.

A Hipótese II, segundo a qual os extratos mais ativos manteriam atividade inseticida em concentrações inferiores às empregadas na triagem inicial, foi parcialmente sustentada. A redução da concentração dos extratos selecionados foi acompanhada, de modo geral, por diminuição da intensidade da atividade inseticida, embora os tratamentos tenham mantido efeito sobre as operárias em concentrações inferiores às da triagem. Esse comportamento sugere que a intensidade da resposta está relacionada à quantidade de extrato à qual os indivíduos são expostos. Resultados semelhantes foram observados em estudos com extratos vegetais sobre formigas-cortadeiras, nos quais a concentração influenciou a intensidade da resposta tóxica e a sobrevivência das operárias (Santos et al., 2013; Silva et al., 2019). Assim, a manutenção da atividade nas menores concentrações sustenta parcialmente a hipótese proposta, enquanto a redução da resposta evidencia a importância da concentração na expressão do efeito inseticida.

A resposta diferencial entre as castas também deve ser considerada na interpretação dos resultados. No presente estudo, as operárias jardineiras apresentaram, em determinados tratamentos, maior redução da sobrevivência em comparação às forrageadoras, enquanto estas

últimas mantiveram maior sobrevivência em algumas condições avaliadas. Essa diferença entre castas é particularmente relevante no contexto das formigas-cortadeiras, uma vez que forrageadoras e jardineiras desempenham funções distintas na organização da colônia (Dourado et al., 2024). As forrageadoras estão principalmente envolvidas no corte e transporte de material vegetal, enquanto as jardineiras participam de atividades relacionadas ao processamento do material vegetal e ao cultivo do fungo (Della-Lucia et al., 1993b; Wilson, 1980). Nesse contexto, a baixa toxicidade sobre as forrageadoras pode ser desejável em estratégias baseadas em iscas, pois poderia favorecer o transporte do material tratado para o interior da colônia, onde o processamento pelas diferentes castas pode contribuir para a transferência do ingrediente ativo entre as diferentes operárias da colônia (Camargo et al., 2015; Graebin et al., 2024).

A Hipótese III, relacionada à possibilidade de que o fracionamento biomonitorado permitisse concentrar a atividade inseticida em uma ou mais frações, foi parcialmente sustentada. O direcionamento do fracionamento para a fração 7–11, selecionada por apresentar maior atividade inseticida entre as amostras avaliadas, permitiu aprofundar a relação entre composição química e bioatividade. Entretanto, a redução da atividade após a separação cromatográfica, em comparação com o material de origem, sugere que a bioatividade pode depender da presença conjunta de diferentes constituintes. Em produtos naturais, a atividade de uma mistura pode resultar da ação combinada de seus componentes, e a separação pode romper interações responsáveis pelo efeito observado no extrato bruto (Caesar; Cech, 2019). Essa possibilidade também é relevante para produtos botânicos utilizados como bioinseticidas, nos quais diferentes constituintes podem interagir e modificar a atividade da mistura (Isman; Norris, 2024). Contudo, no presente estudo, essa interpretação deve ser considerada apenas uma possibilidade, uma vez que não foram realizados ensaios de combinação ou recombinação capazes de demonstrar formalmente efeitos aditivos ou sinérgicos.

A caracterização química da fração 7–11 forneceu elementos adicionais para interpretar sua atividade. Os ésteres corresponderam a 44,53% da composição da fração, incluindo palmitato de etila (2,52%) e linoleato de etila (3,91%). A possível participação desses constituintes é apoiada por estudos que relataram atividade biológica de compostos relacionados ao linoleato e ao ácido palmítico sobre diferentes artrópodes (Wagan et al., 2018), atividade inseticida do linoleato de etila sobre a traça-das-brásicas *Plutella xylostella* (Peng et al., 2023) e atividade acaricida associada ao palmitato de etila (Mathew; Mathew, 2023). Além disso, a caracterização fitoquímica do arbusto *Isodon rugosus* identificou o palmitato e o linoleato de etila como compostos majoritários, aos quais os autores atribuem atividade inseticida em ensaios contra cupins (*Heterotermes indicola*), formigas-faraó (*Monomorium*

pharaonis), besouros-da-farinha (*Tribolium castaneum*) e carunchos-dos-grãos (*Rhyzopertha dominica*) (Zeb et al., 2017). Esses achados tornam plausível a participação de ésteres na atividade da fração 7–11, mas a comparação com saúva-limão precisa de cautela por envolver diferentes organismos e condições de teste.

As propriedades físico-químicas desses constituintes também podem contribuir para sua atividade. A elevada lipofilicidade descrita para o palmitato de etila favorece sua afinidade por ambientes lipídicos e pode facilitar interações com estruturas ricas em lipídios (Api et al., 2026; Krishnaveni et al., 2022). Em insetos, essa característica poderia favorecer a interação com a camada lipídica da cutícula e interferir em sua função de barreira, constituindo uma possível via para a ação de compostos lipofílicos (Padule et al., 2022). Entretanto, esses mecanismos não foram avaliados diretamente em saúva-limão no presente estudo e, portanto, devem ser considerados hipóteses interpretativas, e não mecanismos de ação demonstrados.

O bioensaio com biodiesel forneceu evidência adicional da associação entre uma composição rica em ésteres e a atividade inseticida. O biodiesel apresentou 98,27% de ésteres de ácidos graxos em sua composição e provocou aproximadamente 80% de mortalidade em operárias jardineiras de saúva-limão na concentração de 1%. Embora o biodiesel não possua histórico tradicional de uso no controle de formigas-cortadeiras, sua inclusão no estudo atuou como uma ferramenta metodológica para testar a hipótese da classe química. O palmitato de etila e o linoleato de etila, também identificados na fração 7–11, corresponderam a 12,34% e 43,95% do biodiesel, respectivamente, valores superiores aos observados na fração, na qual representaram 2,52% e 3,91%. A atividade observada no biodiesel, associada à elevada representação dos ésteres, fornece suporte à possibilidade de que matrizes enriquecidas nessa classe química apresentem atividade inseticida sobre saúva-limão. Entretanto, esse resultado não permite atribuir a mortalidade a um único composto, uma vez que o biodiesel é uma mistura complexa e apresenta diferenças qualitativas e quantitativas em relação à fração 7–11.

A comparação entre as duas matrizes reforça essa interpretação. Embora ambas compartilhem palmitato de etila e linoleato de etila e apresentem atividade inseticida, seus perfis químicos são distintos, especialmente quanto à proporção total de ésteres e à composição dos demais constituintes. Dessa forma, a maior atividade observada no biodiesel pode estar relacionada à maior representação dessa classe química, mas também à composição global e às proporções relativas dos diferentes componentes. A redução da atividade após o fracionamento também é compatível com a possibilidade de que a resposta biológica dependa da composição

conjunta da mistura. Contudo, essa hipótese não permite afirmar a ocorrência de sinergismo, pois sua demonstração exigiria testes individuais e em combinações definidas dos constituintes.

A principal limitação para atribuir a atividade a um composto específico foi a impossibilidade de testar individualmente os constituintes identificados. Embora o palmitato de etila e o linoleato de etila estejam presentes em amostras biologicamente relevantes e apresentem atividade descrita na literatura, eles não foram isolados e avaliados individualmente contra saúva-limão. Além disso, a baixa atividade das frações na concentração avaliada (i.e., 1%) impossibilitou o prosseguimento da purificação até a obtenção de compostos isolados. Portanto, a presença desses constituintes deve ser interpretada como uma associação química com uma amostra biologicamente ativa, e não como evidência de causalidade.

Em conjunto, os resultados fornecem suporte às três hipóteses, embora com diferentes níveis de evidência. Os diferentes sistemas de extração produziram respostas inseticidas distintas, sustentando a Hipótese I; os extratos mais ativos mantiveram atividade em concentrações inferiores, embora com redução da intensidade do efeito, fornecendo suporte parcial à Hipótese II; e o fracionamento biomonitorado permitiu direcionar a investigação para uma fração biologicamente relevante e caracterizar seus principais constituintes, sustentando parcialmente a Hipótese III. Os resultados também apontam os ésteres, particularmente o palmitato de etila e o linoleato de etila, como constituintes possivelmente associados à atividade inseticida, mas não permitem considerá-los, isoladamente, responsáveis pelo efeito observado. Estudos futuros devem avaliar individualmente esses compostos e suas combinações, permitindo determinar suas contribuições para a atividade e possíveis efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos.

5. CONCLUSÃO

Os extratos foliares de chaguinha (*Tropaeolum majus*) reduziram a sobrevivência de operárias forrageadoras e jardineiras de saúva-limão (*A. sexdens*), com respostas dependentes do solvente de extração, da concentração e da casta avaliada. Os extratos de acetato de etila, butan-1-ol e metanol apresentaram maior atividade na triagem inicial, embora nem todos tenham exibido uma relação concentração–resposta linear. O fracionamento biomonitorado direcionou a investigação química para a fração 7–11 do extrato de butan-1-ol, na qual os ésteres corresponderam a 44,53% da composição caracterizada. Entre esses constituintes, o palmitato de etila e o linoleato de etila também foram identificados no biodiesel que apresentou atividade inseticida em saúva-limão. Entretanto, a redução da atividade após o fracionamento e a ausência de ensaios com os

constituintes isolados não permitem atribuir o efeito observado a compostos específicos nem confirmar a ocorrência de sinergismo. Assim, os resultados indicam a chaguinha como fonte potencial de constituintes com atividade sobre a saúva-limão e apontam os ésteres de ácidos graxos como classe química de interesse para estudos posteriores, incluindo avaliações com compostos isolados, combinações definidas e ensaios em condições mais próximas às da colônia.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, K. D.; GANDRA, L. C.; OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, D. J.; DELLA LUCIA, T. M. Effect of azadirachtin on mortality and immune response of leaf-cutting ants. *Ecotoxicology*, v. 28, n. 10, p. 1190–1197, 2019. DOI: 10.1007/s10646-019-02124-z.
- API, A. M.; BARTLETT, A.; BELSITO, D.; BOTELHO, D.; BRUZE, M.; BRYANT-FRIEDRICH, A.; BURTON JÚNIOR, G. A.; CANCELLIERI, M. A.; CHON, H.; CRONIN, M.; CROTTY, S.; DAGLI, M. L.; DEKANT, W.; DEODHAR, C.; FARRELL, K.; FRYER, A. D.; JONES, L.; JOSHI, K.; LAPCZYNSKI, A.; LASKIN, D. L.; LAVELLE, M.; LEE, I.; MOUSTAKAS, H.; MULDOON, J.; PENNING, T. M.; PIERSMA, A. H.; RITACCO, G.; SADEKAR, N.; SCHEMBER, I.; SCHULTZ, T. W.; SIDDIQI, F.; SIPES, I. G.; SULLIVAN, G.; THAKKAR, Y. RIFM fragrance ingredient safety assessment, ethyl palmitate, CAS Registry Number 628-97-7. *Food and Chemical Toxicology*, v. 213, suppl. 1, 116129, 2026. DOI: 10.1016/j.fct.2026.116129.
- BAZYLKO, A.; GRANICA, S.; FILIPEK, A.; PIWOWARSKI, J.; STEFAŃSKA, J.; OSIŃSKA, E.; KISS, A. K. Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 88–94, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.07.003.
- BIAVATTI, 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 the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 1, p. 66–70, 2002. DOI: 10.1590/S0103-50532002000100010.
- BIGI, M. F. M.; TORKOMIAN, V. L.; DE GROOTE, S. T.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. 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. DOI: 10.1002/ps.892.
- BRZOSOWSKI, L.; MAZOUREK, M. A sustainable agricultural future relies on the transition to organic agroecological pest management. *Sustainability*, v. 10, n. 6, 2023, 2018. DOI: 10.3390/su10062023.

BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, v. 30, n. 4, p. 525–545, 2013. DOI: 10.1039/C3NP20106F.

BUTELER, M.; ALMA, A. M.; HERRERA, M. L.; GOROSITO, N. B.; FERNÁNDEZ, P. C. Novel organic repellent for leaf-cutting ants: tea tree oil and its potential use as a management tool. *International Journal of Pest Management*, v. 67, n. 1, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1080/09670874.2019.1657201.

CAESAR, L. K.; CECHE, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, v. 36, n. 6, p. 869–888, 2019. DOI: 10.1039/C9NP00011A.

CAMARGO, R. S.; SILVA, L. C.; FORTI, L. C.; MATOS, C. A. O.; TRAVAGLINI, R. V. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology*, v. 62, n. 4, p. 484–493, 2015. DOI: 10.13102/sociobiology.v62i4.772.

ČESLOVÁ, L.; KLIKAROVÁ, J.; ŠALOMOUNOVÁ, T. The content and profile of biologically active compounds present in individual parts of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): comprehensive study. *European Food Research and Technology*, v. 249, n. 2, p. 413–428, 2023. DOI: 10.1007/s00217-022-04126-4.

CONLON, B. H.; O'TUAMA, D.; MICHELSEN, A.; CRUMIÈRE, A. J. J.; SHIK, J. Z. A fungal symbiont converts provisioned cellulose into edible yield for its leafcutter ant farmers. *Biology Letters*, v. 18, n. 4, 20220022, 2022. DOI: 10.1098/rsbl.2022.0022.

DEFAGÓ, M. T.; NOLLI, L.; NAPAL, G. D.; PALACIOS, S. M.; BUFFA, L. M. Can the extract of *Aristolochia argentina* Griseb. affect the foraging decisions of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii* (Guérin)? Preliminary assays. *International Journal of Pest Management*, v. 63, n. 3, p. 207–212, 2017. DOI: 10.1080/09670874.2017.1327680.

DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. *Nature Communications*, v. 5, 5675, 2014. DOI: 10.1038/ncomms6675.

DELLA LUCIA, T. M. C. et al. Metodologia de manutenção das colônias de *Atta sexdens*. 1993a.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; ARAÚJO, M. S. Castas de formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). *As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993b. p. 43–53.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.

DOURADO, L. A.; OLIVIERA, L. L.; RAIMUNDO, A. P. P.; SERRÃO, J. E. Population profile of haemocytes in the subcastes of the leaf-cutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) unveiled by flow cytometry. *Physiological Entomology*, v. 49, n. 4, p. 392–400, 2024. DOI: 10.1111/phen.12456.

FREI, P.; NADEGGER, C.; VOLLMAR, A. M.; MÜLLER, T.; MOSER, S. Structural characterization, and antioxidative and anti-inflammatory activities of phylloxanthobilins in *Tropaeolum majus*, a plant with relevance in phytomedicine. *Planta Medica*, v. 90, n. 7–8, p. 641–650, 2024. DOI: 10.1055/a-2225-8314.

GANDRA, L. C. *Formigas-cortadeiras versus chaguinha (Tropaeolum majus): personalidade, rede social e toxicidade*. 2018. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

GANDRA, L. C.; AMARAL, K. D.; COUCEIRO, J. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Management Science*, v. 72, n. 8, p. 1475–1481, 2016. DOI: 10.1002/ps.4239.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 2010. DOI: 10.1126/science.1185383.

GRAEBIN, A.; AMARAL, K. D.; LIRA, D. C.; COLLARES, L. J.; BERNARDES, R. C.; TURCHEN, L. M.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Nasturtium leaf compounds, diphenyl disulfide and lyral, against *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungi. *Journal of Economic Entomology*, v. 117, n. 5, p. 1703–1711, 2024. DOI: 10.1093/jee/toae154.

HAVLÍKOVÁ, L. C. H.; DMYTRYŠYN, M.; KOČOVÁ VLČKOVÁ, H.; KOSTURKO, Š.; CHOCHOLOUŠ, P.; ŠVEC, F. Processing-induced hydrolysis and degradation pathways of glucotropaeolin in edible garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) extracts. *Food Chemistry: X*, v. 37, 104162, 2026. DOI: 10.1016/j.fochx.2026.104162.

HUANG, Z.; BI, T.; JIANG, H.; LIU, H. Review on NMR as a tool to analyse natural products extract directly: molecular structure elucidation and biological activity analysis. *Phytochemical Analysis*, v. 35, n. 1, p. 5–16, 2024. DOI: 10.1002/pca.3292.

ISMAN, M. B.; NORRIS, E. J. Bioinsecticide synergy: the good, the bad and the unknown. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, v. 42, 100583, 2024. DOI: 10.1016/j.coesh.2024.100583.

JACOB, E. J. Natural products-based drug discovery: some bottlenecks and considerations. *Current Science*, v. 96, p. 753–754, 2009.

JHALA, J.; BALODA, A. S.; RAJPUT, V. S. Role of biopesticides in recent trends of insect pest management: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 9, p. 2237–2240, 2020.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958. DOI: 10.1080/01621459.1958.10501452.

KRISHNAVENI, K.; MURUGAN, M.; KALAIMATHI, R. V.; BASHA, A. N.; PALLAN, G. A.; KANDEEPAN, C.; ...; DHAKAR, R. C. ADMET informatics of plant derived *n*-hexadecanoic acid (palmitic acid). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 12, p. 132–145, 2022.

KUBO, I.; HANKE, F. J. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: MILLER, J. R.; MILLER, T. A. (Eds.). *Insect-Plant Interactions*. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 225–249.

KUMAR, A.; NIRMAL, P.; KUMAR, M.; JOSE, A.; TOMER, V.; OZ, E.; PROESTOS, C.; ZENG, M.; ELOBEID, T.; K, S.; OZ, F. Major phytochemicals: recent advances in health benefits and extraction method. *Molecules*, v. 28, n. 2, 887, 2023. DOI: 10.3390/molecules28020887.

LEFEBVRE, T.; DESTANDAU, E.; LESELLIER, E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: a review. *Journal of Chromatography A*, v. 1635, 461770, 2021. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461770.

LININGTON, R. G.; KUBANEK, J.; LUESCH, H. New methods for isolation and structure determination of natural products. *Natural Product Reports*, v. 36, n. 7, p. 942–943, 2019. DOI: 10.1039/C9NP90023C.

LOURENÇO, E. L. B.; MULLER, J. C.; BOARETO, A. C.; GOMES, C.; LOURENÇO, A. C.; CALLOI PALOZI, R. A.; LIMA PRANDO, T. B.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; DALSENER, P. R. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from *Tropaeolum majus* L. in rat preimplantation embryos: evidence for the dehydroepiandrosterone and estradiol role. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, 209207, 2014. DOI: 10.1155/2014/209207.

LOURENÇO, E. L. B.; MULLER, J. C.; BOARETO, A. C.; GOMES, C.; LOURENÇO, A. C.; MINATOVICZ, B.; CRESTANI, S.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; DALSENER, P. R. Screening for in vivo (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, n. 1, p. 418–423, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.004.

MAGALHÃES, M. Alternativas para controle de populações de *Atta sexdens*: uma revisão sobre a eficácia de inseticidas de produtos naturais botânicos. *Acta Biologica Brasiliensia*, v. 8, n. 2, p. 417–436, 2025. DOI: 10.18554/acbiobras.v8i2.8761.

MALDONADO, Y. E.; MONTALVÁN, M.; CUMBICUS, N.; GILARDONI, G. Chemical and enantioselective analyses of an unprecedented essential oil from Ecuadorian *Aiouea montana*: a natural source of S-methyl-O-2-phenylethyl carbonothioate. *ACS Omega*, v. 9, n. 24, p. 26495–26502, 2024. DOI: 10.1021/acsomega.4c02993.

MARCARINO, M. O.; CICETTI, S.; ZANARDI, M. M.; SAROTTI, A. M. A critical review on the use of DP4+ in the structural elucidation of natural products: the good, the bad and the ugly. A practical guide. *Natural Product Reports*, v. 39, n. 1, p. 58–76, 2022. DOI: 10.1039/D1NP00030F.

MATHEW, M.; MATHEW, A. GC-MS analysis of petroleum ether extract of *Notothylas indica* Kashyap for detecting compounds with antifeedant properties. *South Asian Journal of Experimental Biology*, v. 13, n. 4, p. 283–288, 2023. DOI: 10.38150/sajeb.13(4).p283-288.

MENEGHETTI, C.; REBELO, R. A.; VITORINO, M. D. Efeito do óleo essencial das folhas de *Drimys angustifolia* em colônias de *Acromyrmex* spp. em plantio de *Pinus taeda*. *Floresta*, v. 45, n. 4, p. 755–768, 2015. DOI: 10.5380/rf.v45i4.37111.

NAGAMOTO, N. S.; CARLOS, A. A.; MOREIRA, S. M.; VERZA, S. S.; HIROSE, G. L.; FORTI, L. C. Differentiation in selection of dicots and grasses by the leaf-cutter ants *Atta capiguara*, *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology*, v. 54, n. 1, p. 127–138, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). *NIST Standard Reference Database 1A: NIST Mass Spectral Libraries, 2026 Edition with Search Program*. Data version NIST26; software version 4.0. Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology, 2026.

NAZARSKI, R. B. On the use of deuterated organic solvents without TMS to report $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR spectral data of organic compounds: current state of the method, its pitfalls and benefits, and related issues. *Molecules*, v. 28, n. 11, 4369, 2023. DOI: 10.3390/molecules28114369.

PADULE, K.; SHINDE, S.; CHITLANGE, S.; GIRAM, P.; NAGORE, D. The advancement of herbal-based nanomedicine for hair. *Cosmetics*, v. 9, n. 6, 118, 2022. DOI: 10.3390/cosmetics9060118.

PENG, J.; CHEN, Z.; CHEN, X.; ZHENG, R.; LU, S.; SEYAB, M.; YANG, F.; LI, Q.; TANG, Q. Insecticidal potential of a *Consolida ajacis* extract and its major compound (ethyl linoleate) against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 195, 105557, 2023. DOI: 10.1016/j.pestbp.2023.105557.

PEREIRA, J. R. Métodos de controle de formigas cortadeiras em sistemas orgânicos de produção: uma revisão. *Revista Ambientale*, v. 13, n. 4, p. 10–24, 2021. DOI: 10.48180/ambientale.v13i4.318.

PETO, R.; PETO, J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (General)*, v. 135, n. 2, p. 185–198, 1972. DOI: 10.2307/2344317.

R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. Version 4.2.1. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; BACCI, L.; MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C. Effect of plant extracts on survival of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 52, n. 2, p. 387–398, 2008.

RIBEIRO, M. M. R. *Atividade formicida de IB 151239 em Atta sexdens rubropilosa*. 2011. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ROBIEN, W. A critical evaluation of the quality of published ^{13}C NMR data in natural product chemistry. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. v. 105, p. 137–215, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-49712-9_3.

SANTOS, M. A. I.; CORRÊA, A. D.; ALVES, A. P. C.; SIMÃO, A. A.; ALVES, D. S.; OLIVEIRA, R. L.; SACZK, A. A.; CARVALHO, G. A. Cassava leaf methanolic extract as an alternative to control of fall armyworm and leaf cutter ants. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6Supl1, p. 3501–3512, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3501.

SAVERSCHEK, N.; HERZ, H.; WAGNER, M.; ROCES, F. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour*, v. 79, n. 3, p. 689–698, 2010. DOI: 10.1016/j.anbehav.2009.12.021.

SILVA, L. V. B.; VASCONCELOS, H. L. Plant palatability to leaf-cutter ants (*Atta laevigata*) and litter decomposability in a Neotropical woodland savanna. *Austral Ecology*, v. 36, n. 5, p. 504–510, 2011. DOI: 10.1111/j.1442-9993.2010.02169.x.

SILVA, M. E.; MUSSURY, R. M.; VIEIRA, M. C.; ALVES JUNIOR, V. V.; PEREIRA, Z. V.; SCALON, S. P. Q. Floral biology of *Tropaeolum majus* L. and its relation with *Astylus variegatus* (Germar 1824) activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1251–1258, 2011. DOI: 10.1590/S0001-37652011005000046.

SILVA MELO, M.; SANTOS SILVA, C. L.; TENÓRIO, A. C. T.; SILVA MELO, B.; DA SILVA BARBOSA, R.; SARMENTO, R. A.; HOLZBACH, J. C.; CRUZ, Á. B.; NASCIMENTO, I. R.; DE SOUZA, D. J. Flavonoids from *Kalanchoe* × *laetivirens* impair survival and immunity of *Atta sexdens*. *The Natural Products Journal*, v. 14, n. 3, p. 21–30, 2024. DOI: 10.2174/2210315514666230808142940.

SILVA, T. C.; CAMARGO, A. B.; SANCHES, L. A.; GARLET, J. *Musa acuminata* pseudostem extract on the control of *Atta sexdens rubropilosa*. *Bioscience Journal*, v. 35, n. 2, p. 459–466, 2019. DOI: 10.14393/BJ-v35n2a2019-41780.

CELANTE, D.; SCHENKEL, J. V. D.; DE CASTILHOS, F. Biodiesel production from soybean oil and dimethyl carbonate catalyzed by potassium methoxide. *Fuel*, v. 212, p. 101–107, 2018. DOI: 10.1016/j.fuel.2017.10.040.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 14, p. 2923–2925, 1978. DOI: 10.1021/jo00408a041.

TEIXEIRA, F. V.; DE MELO SOUZA, T. R.; CASTELLANI, M. A.; DA SILVA CAMARGO, R.; FORTI, L. C.; DE PAULA, V. F.; SILVA, A.; DE MATOS, C. A. O.; NIPATO, Ó. B.; MOREIRA, A. A.; SABATTINI, J. A. Bioactivity of plant extracts against *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) workers by ingestion. *International Journal of Tropical Insect Science*, v. 43, n. 4, p. 1227–1236, 2023. DOI: 10.1007/s42690-023-01030-6.

TLAK GAJGER, I.; DAR, S. A. Plant allelochemicals as sources of insecticides. *Insects*, v. 12, n. 3, 189, 2021. DOI: 10.3390/insects12030189.

VRCA, I.; JUKIĆ, D.; RADIĆ, J.; ANĐELIĆ, I. Phenolic compounds in edible *Tropaeolum majus* L. leaves and its in vitro digestion. *Analytica*, v. 6, n. 2, 14, 2025. DOI: 10.3390/analytica6020014.

WAGAN, T. A.; CAI, W.; HUA, H. Repellency, toxicity, and anti-oviposition of essential oil of *Gardenia jasminoides* and its four major chemical components against whiteflies and mites. *Scientific Reports*, v. 8, 9375, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27366-5.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta) I. The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 7, p. 143–156, 1980.

YANG, F.; LIANG, Z.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; LIU, L.; SONG, H.; XIN, G. Mass spectral database-based methodologies for the annotation and discovery of natural products. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 23, n. 4, p. 410–420, 2025. DOI: 10.1016/S1875-5364(25)60852-1.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests*, v. 5, p. 439–454, 2014. DOI: 10.3390/f5030439.

ZEB, A.; ULLAH, F.; AYAZ, M.; AHMAD, S.; SADIQ, A. Demonstration of biological activities of extracts from *Isodon rugosus* Wall. ex Benth.: separation and identification of bioactive phytoconstituents by GC-MS analysis in the ethyl acetate extract. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, v. 17, 284, 2017. DOI: 10.1186/s12906-017-1798-9.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, v. 13, 20, 2018. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desta tese demonstram o potencial de produtos de origem vegetal como fontes de substâncias com atividade sobre formigas-cortadeiras e seu fungo simbionte. A síntese das evidências disponíveis mostrou que diferentes fitoquímicos apresentam efeitos inseticidas e fungicidas, embora a elevada heterogeneidade entre os estudos e a limitada disponibilidade de parâmetros quantitativos restrinjam a comparação dos resultados entre diferentes pesquisas.

Os experimentos com óleos essenciais evidenciaram que a atividade inseticida varia conforme o produto, a espécie e a casta das formigas, enquanto a atividade fungicida foi observada para o fungo simbionte em determinadas condições de exposição. Esses resultados reforçam a importância de considerar diferentes componentes da associação entre as formigas-cortadeiras e *Leucoagaricus gongylophorus* na investigação de produtos destinados ao controle dessas pragas.

A investigação de *Tropaeolum majus* demonstrou atividade inseticida de seus extratos sobre *Atta sexdens* e permitiu direcionar a investigação química para uma fração associada à maior atividade. A caracterização dessa fração indicou a predominância de compostos da classe dos ésteres, fornecendo subsídios para o aprofundamento da investigação dos constituintes relacionados à atividade observada.

Em conjunto, os resultados ampliam as evidências sobre o potencial de produtos de origem vegetal para o controle de formigas-cortadeiras e indicam que o avanço dessa área depende da integração entre avaliação biológica, caracterização química e maior padronização dos estudos, considerando as diferenças entre espécies, castas e o fungo simbionte.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA (CAPÍTULO 3)

Tabela A1. Frações obtidas da coluna de acetato de etila de *Tropaeolum majus* e respectivas técnicas de caracterização e principais identificações químicas.

Fração	Técnicas de caracterização	Principais compostos/identificação
12–13	IV	—
14–33	IV, CG-EM	Ácido palmítico; ácido linolênico
34–55	IV, CG-EM	Ácido palmítico; ácido linolênico
56–62	IV, CG-EM	Ácido palmítico
63–69	IV, CG-EM	Ácido palmítico; ácido linolênico
70–87	—	Não identificado
88–102	—	Não identificado
103–107	—	Não identificado
108–123	RMN, IV	Ácidos graxos
124–132	IV, CG-EM	Octadec-11-enoato de etila
133–134	—	Não identificado
135–142	IV, CG-EM	1-Monoacetato de glicerol
143–150	IV, CG-EM	1-Monoacetato de glicerol
151–168	IV, CG-EM	1-Monoacetato de glicerol e 1,2-Diacetato de glicerol
169–177	RMN, IV	Mistura complexa
178–195	—	—
196–213	—	—
214–225	—	—
226–240	—	—
241–255	—	—

Nota: IV = espectroscopia no infravermelho; RMN = ressonância magnética nuclear; CG-EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; — = informação não disponível ou não indicada para a fração.

Fração 12–13

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 14–33

Constituintes identificados por CG-EM: ácido palmítico e ácido linolênico.

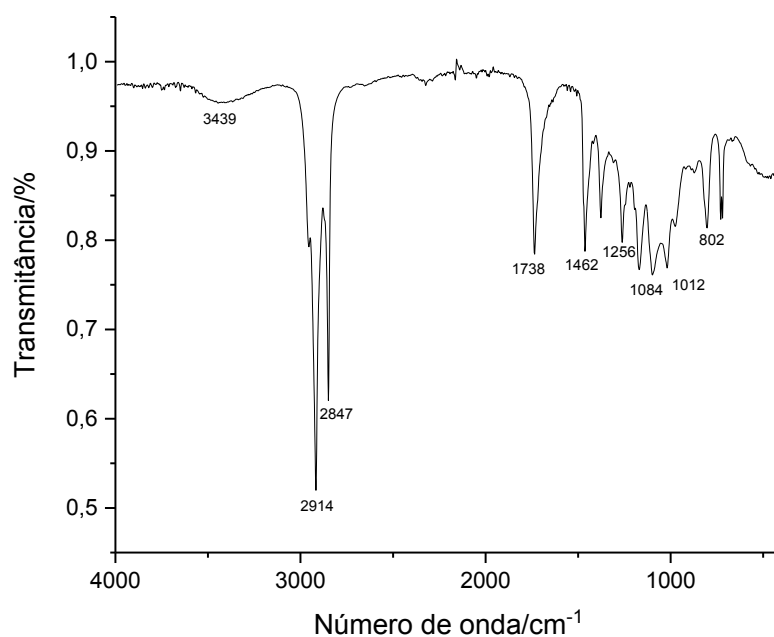


Figura A1. Espectro de FTIR da fração 14–33 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 34–55

Constituintes identificados por CG-EM: ácido palmítico e ácido linolênico.

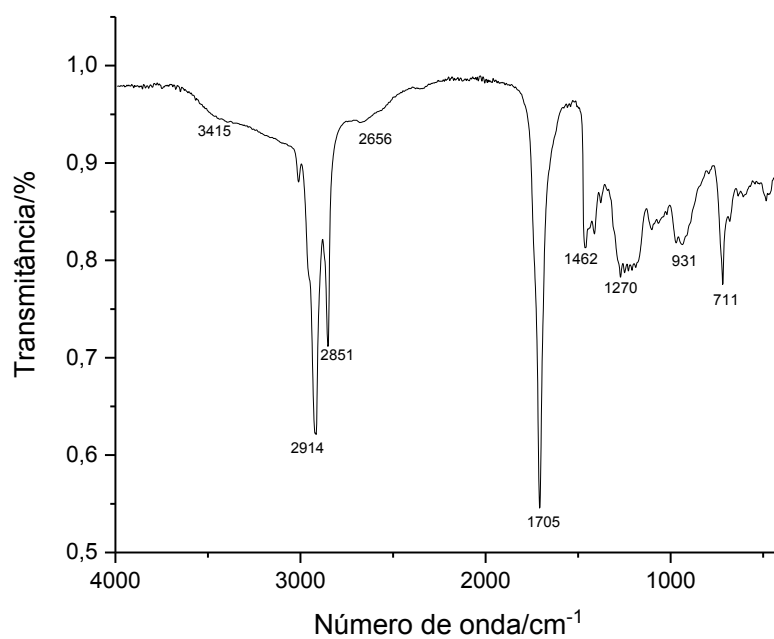


Figura A2. Espectro de FTIR da fração 34–55 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 56–62

Constituinte identificado por CG-EM: ácido palmítico.

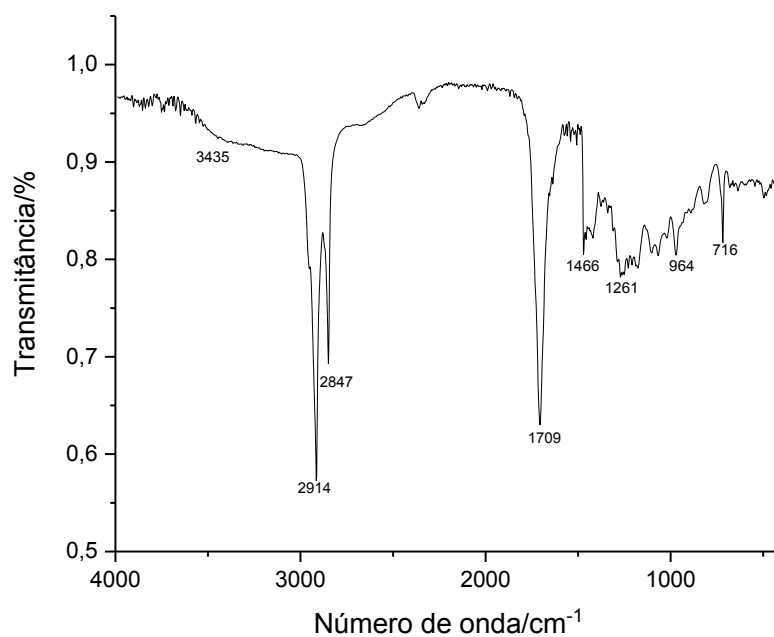


Figura A3. Espectro de FTIR da fração 56–62 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 63–69

Constituintes identificados por CG-EM: ácido palmítico e ácido linolênico.

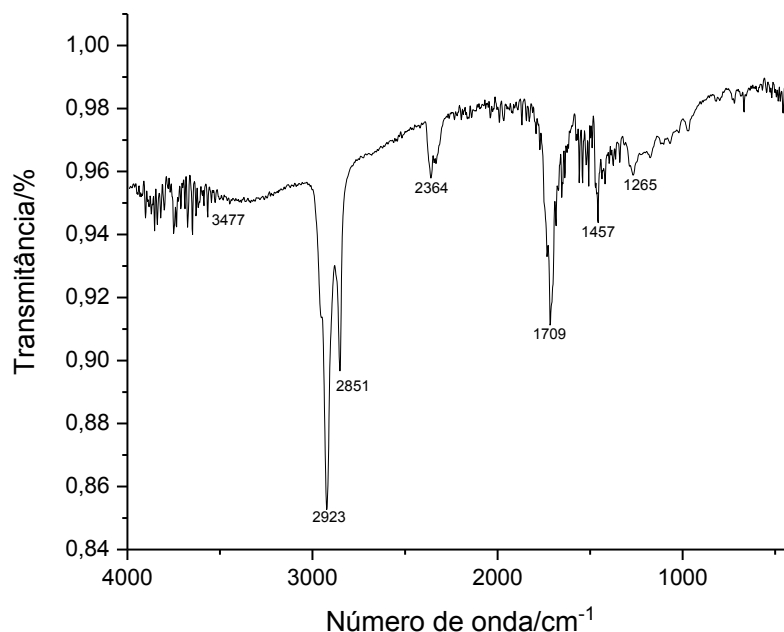


Figura A4. Espectro de FTIR da fração 63–69 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Frações 70–87

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Frações 88–102

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Frações 103–107

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 108–123

Identificação química: ácido graxo e hidroxila carbonila.

1. Dados de RMN de ^1H

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,41–7,27 (m, 1H), 6,96–6,81 (m, 1H), 5,48–5,35 (m, 3H), 5,39–5,28 (m, 1H), 4,20 (qd, $J = 11,7$; 5,4 Hz, 1H), 4,02–3,82 (m, 2H), 3,80–3,58 (m, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,81 (t, $J = 10,4$ Hz, 1H), 2,36 (td, $J = 7,5$; 3,6 Hz, 2H), 2,16–2,04 (m, 4H), 2,01 (s, 1H), 1,42–1,25 (m, 17H), 1,33 (s, 4H), 1,00 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 0,95–0,78 (m, 2H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 174,42; 132,55; 131,98; 130,25; 130,02; 129,90; 129,38; 128,65; 128,31; 128,25; 128,16; 127,77; 127,12; 115,98; 115,34; 77,23; 70,30; 65,16; 63,34;

62,37; 34,15; 31,93; 31,53; 29,71; 29,57; 29,36; 29,15; 29,09; 27,20; 27,01; 25,62; 25,54; 24,89; 24,80; 22,69; 22,57; 20,56; 14,28; 14,12.

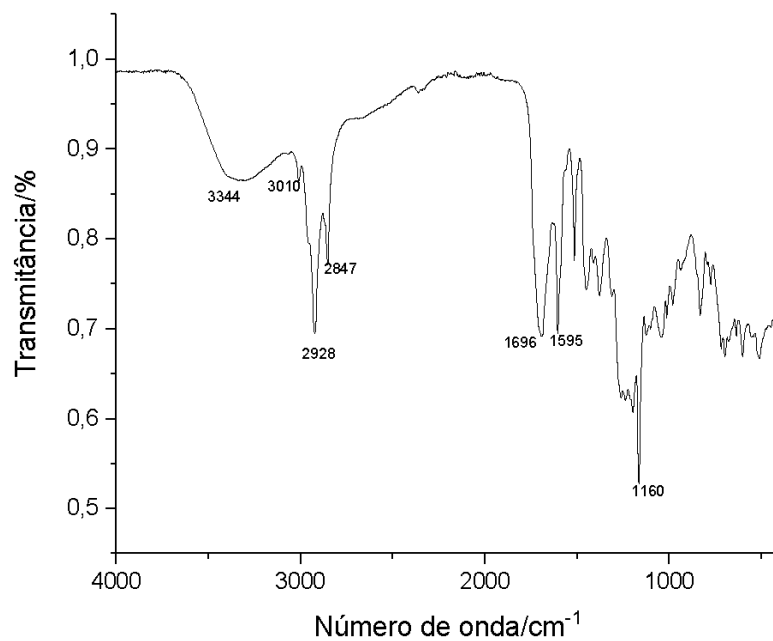


Figura A5. Espectro de FTIR da fração 108–123 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 124-132

Constituinte identificado por CG-EM: octadec-11-enoato de etila.

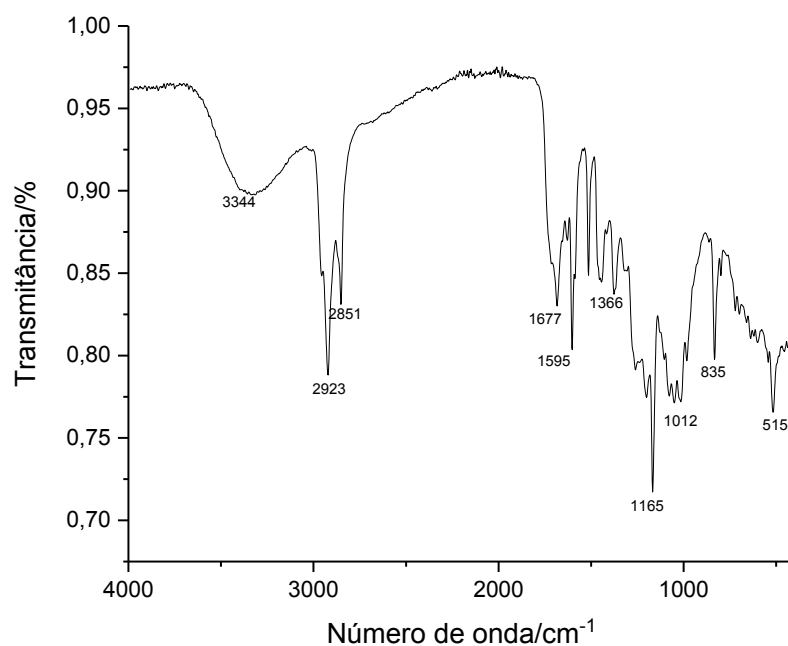


Figura A6. Espectro de FTIR da fração 124–132 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 133-134

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 135-142

Constituinte identificado por CG-EM: 1-monoacetato de glicerol.

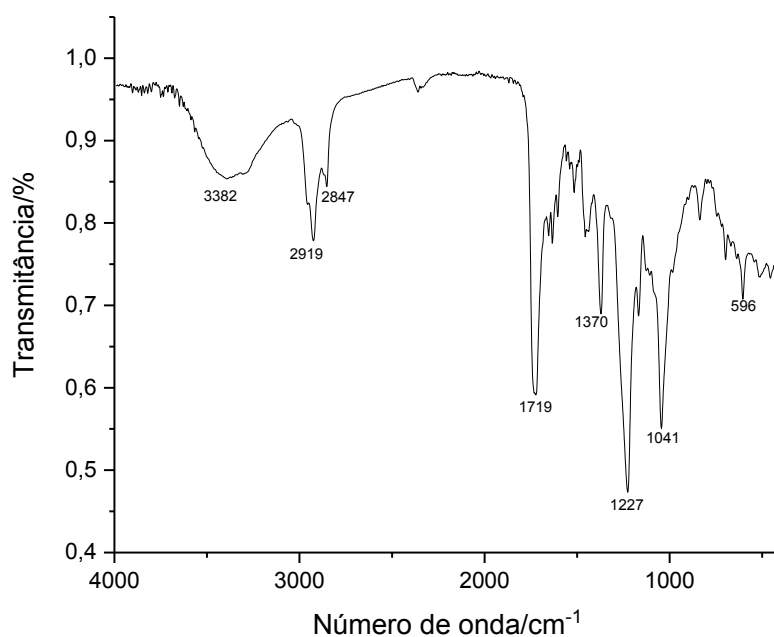


Figura A7. Espectro de FTIR da fração 135–142 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 143-150

Constituinte identificado por CG-EM: 1-monoacetato de glicerol.

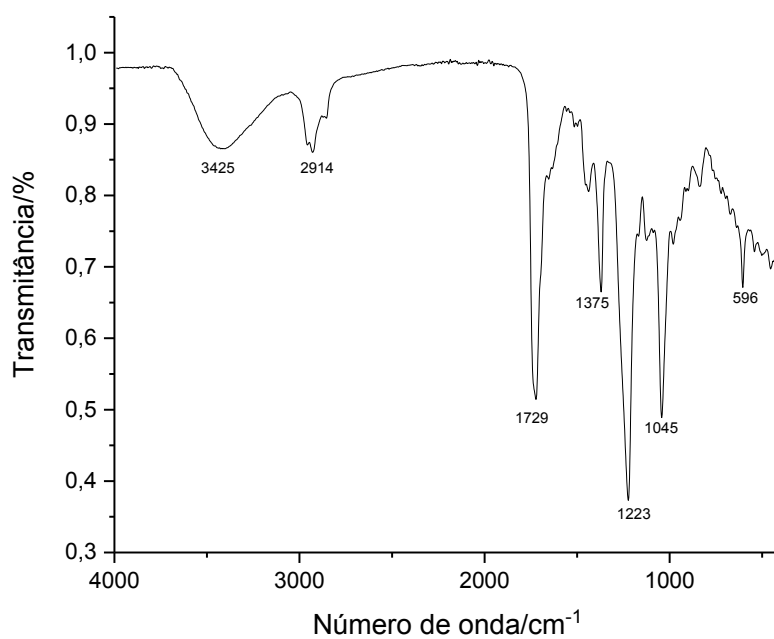


Figura A7. Espectro de FTIR da fração 143–150 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 151-168

Constituintes identificados por CG-EM: 1-monoacetato de glicerol e 1,2-diacetato de glicerol.

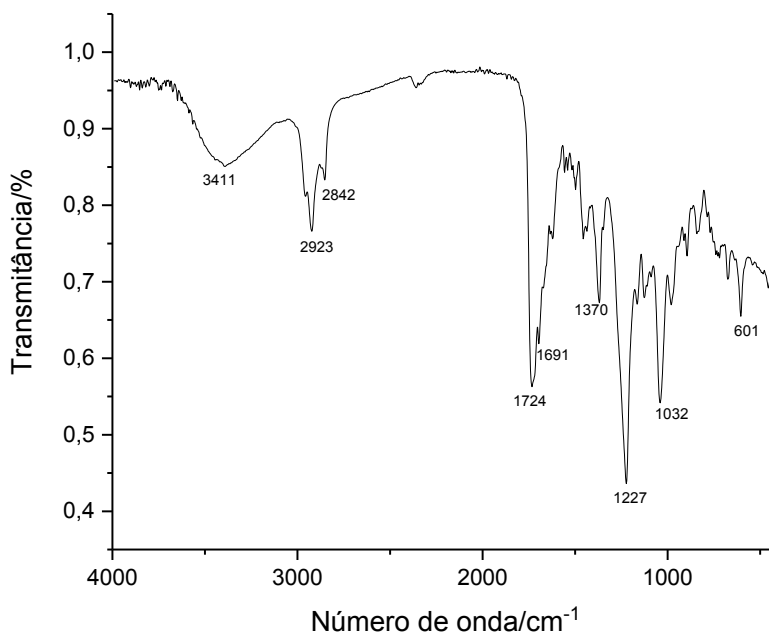


Figura A8. Espectro de FTIR da fração 151–168 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 169-177

Identificação química: mistura complexa contendo quinonas, lactonas, ácidos graxos, aldeídos, ácidos e ésteres de cadeia longa.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.44 (d, $J = 18.6$ Hz, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.58 – 8.48 (m, 1H), 7.95 (ddt, $J = 17.3, 11.4, 8.6$ Hz, 1H), 7.44 – 7.19 (m, 1H), 6.34 – 6.22 (m, 1H), 6.17 (ddd, $J = 12.3, 3.7, 2.1$ Hz, 1H), 5.36 (dt, $J = 13.4, 3.7$ Hz, 0H), 5.32 (s, 1H), 4.52 – 4.37 (m, 1H), 4.36 – 4.09 (m, 1H), 4.01 – 3.87 (m, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.73 – 3.56 (m, 4H), 3.39 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 3.20 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.72 – 2.53 (m, 1H), 2.46 – 2.17 (m, 1H), 2.17 – 1.96 (m, 1H), 1.86 – 1.76 (m, 1H), 1.74 – 1.52 (m, 3H), 1.32 (dt, $J = 6.6, 3.7$ Hz, 1H), 1.31 (s, 1H), 1.33 – 1.03 (m, 10H), 1.06 – 0.76 (m, 3H), 0.88 (s, 3H), -1.62 (s, 1H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 196.87, 189.80, 177.06, 176.96, 172.28, 171.59, 169.72, 161.29, 160.38, 155.75, 155.38, 151.00, 150.78, 149.73, 149.12, 145.25, 145.04, 142.16, 141.71, 137.92, 137.79, 136.60, 136.35, 136.29, 136.20, 136.08, 135.88, 131.94, 131.68, 130.52, 130.17, 129.15, 129.04, 129.02, 128.80, 128.75, 128.31, 127.80, 127.75, 122.81, 122.58, 115.58, 105.89, 105.07, 104.45, 104.14, 97.52, 97.12, 93.19, 93.08, 77.25, 66.78, 65.82, 64.70, 53.45, 52.94, 51.52, 51.06, 50.29, 50.14, 50.05, 48.11, 47.98, 45.02, 42.25, 35.24, 33.87, 33.35, 31.94, 31.91, 30.92, 30.84, 30.56, 29.72, 29.66, 29.60, 29.37, 29.35, 23.13, 23.08, 22.70, 20.87, 20.13, 19.42, 17.42, 17.40, 14.13, 12.09, 12.02, 11.20.

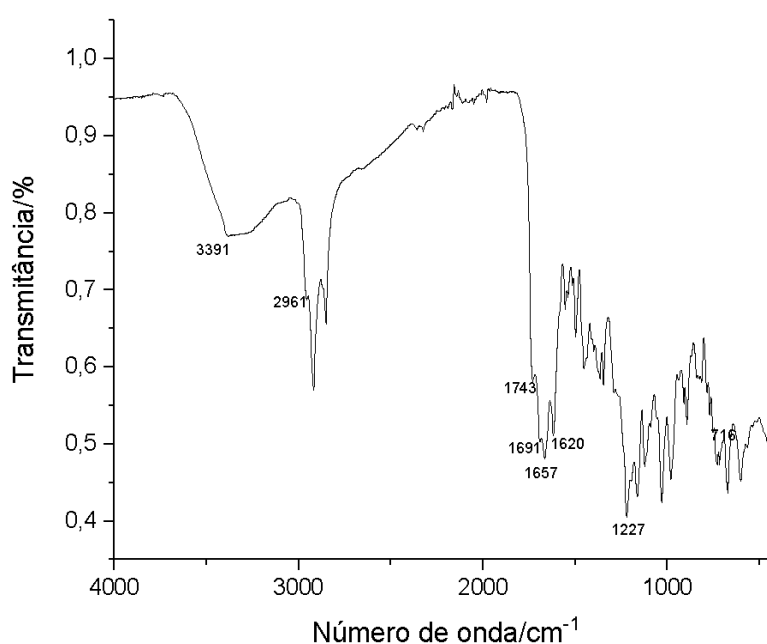


Figura A8. Espectro de FTIR da fração 169–177 do extrato de acetato de etila de *Tropaeolum majus*.

Fração 178-195

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 196-213

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 214-225

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 226-240

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 241-255

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO DE METANOL

Tabela B1. Frações obtidas da coluna de metanol de *Tropaeolum majus* e respectivas técnicas de caracterização e principais identificações químicas.

Fração	Técnicas de caracterização	Principais compostos/identificação
5	-	-
6–9	RMN, IV, CG-EM	Mistura de ésteres
10–35	RMN, IV, CG-EM	Ácidos graxos, aldeídos graxos, monooleína, monolinoleína, monopalmitoleína, ésteres graxos de glicerol e derivados de solketal
36–57	RMN, IV, CG-EM	Ácidos graxos, ésteres graxos, monoacilgliceróis, lactonas terpênicas e derivados oxigenados de terpenos
58–137	RMN, IV, CG-EM	4-Benzoyloxy-2-methylpyridine 1-oxide e ácidos graxos
138–159	RMN, IV, CG-EM	Ácidos graxos, ésteres graxos, triacilgliceróis, monoacilgliceróis e diacilgliceróis

Nota: IV = espectroscopia no infravermelho; RMN = ressonância magnética nuclear; CG-EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; — = informação não disponível ou não indicada para a fração.

Fração 5

Não foram identificados constituintes químicos por CG-EM nas condições analíticas utilizadas.

Fração 6-9

Identificação química: mistura de ésteres.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.43 – 5.33 (m, 1H), 5.32 (s, 5H), 5.19 – 5.08 (m, 2H), 4.21 – 4.08 (m, 1H), 2.83 (s, 1H), 2.87 – 2.75 (m, 1H), 2.39 – 2.27 (m, 1H), 2.11 (s, 1H), 2.10 – 1.97 (m, 6H), 1.77 (dd, $J = 4.2, 1.3$ Hz, 1H), 1.71 (dt, $J = 2.4, 1.3$ Hz, 5H), 1.62 (dt, $J = 3.1, 1.5$ Hz, 5H), 1.45 (q, $J = 6.0$ Hz, 1H), 1.41 – 1.28 (m, 13H), 1.28 (s, 7H), 1.12 – 0.96 (m, 1H), 0.89 (tdd, $J = 8.6, 6.5, 3.0$ Hz, 5H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 135.38, 135.29, 135.24, 135.21, 134.97, 134.90, 131.96, 131.25, 130.24, 130.02, 128.30, 128.25, 128.08, 127.91, 127.76, 127.12, 125.03, 125.01, 124.95, 124.90, 124.54, 124.48, 124.42, 124.27, 124.24, 124.15, 77.24, 72.04, 62.11, 61.22, 59.02, 53.43, 39.87, 39.78, 39.74, 39.38, 37.50, 37.46, 37.44, 37.37, 37.31, 36.64, 34.40, 34.03, 32.81, 32.24, 32.22, 32.20, 32.00, 31.94, 31.92, 31.54, 29.71, 29.68, 29.64, 29.59, 29.50, 29.38, 29.36, 29.34, 29.29, 29.19, 29.13, 29.10, 27.99, 27.21, 26.78, 26.72, 26.69, 26.65, 26.42, 26.38, 26.32, 25.70, 25.67, 25.63, 25.54, 25.05, 24.88, 24.85, 24.81, 24.48, 23.47, 23.44, 23.37, 22.71, 22.63, 22.59, 20.56, 19.76, 19.72, 17.68, 16.37, 16.01, 14.28, 14.13, 14.08.

Principais regiões observadas no espectro de RMN de ^{13}C :

Região olefínica (δ 124–135 ppm): presença de diversos carbonos sp^2 associados a estruturas insaturadas.

Carbonos oxigenados (δ 53–72 ppm): sinais compatíveis com carbonos ligados a oxigênio, associados a álcoois, éteres ou ésteres.

Região alifática (δ 14–40 ppm): predominância de sinais atribuídos a carbonos de cadeias hidrocarbonadas.

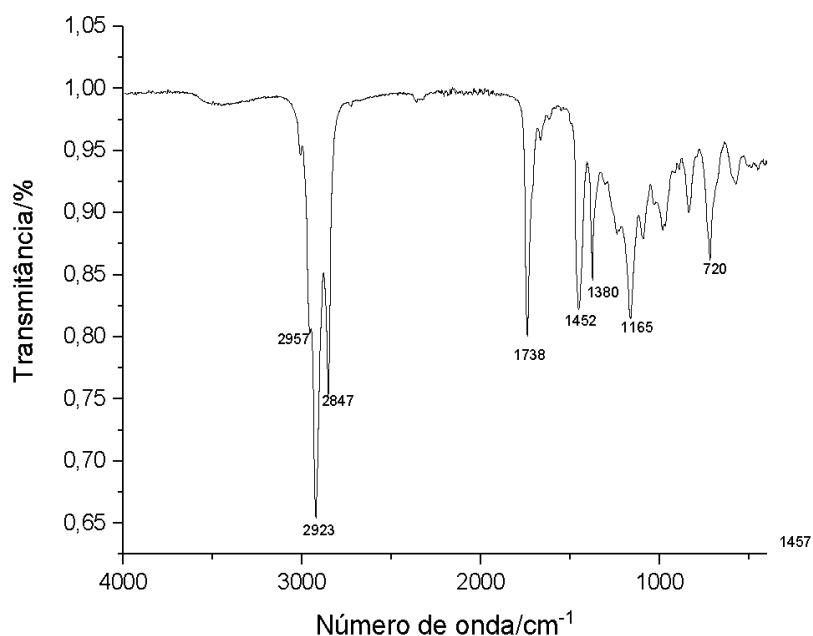


Figura B1. Espectro de FTIR da fração 6–9 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*.

Fração 10-35

Identificação química: ácidos graxos, aldeídos graxos, monooleína, monolinoleína, monopalmitoleína, ésteres graxos de glicerol e derivados de solketal.

Constituintes identificados por CG-EM: ácidos graxos e aldeído graxo.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.45 – 5.33 (m, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.19 – 5.09 (m, 1H), 4.24 – 4.07 (m, 1H), 2.81 (dt, $J = 14.3, 6.3$ Hz, 1H), 2.41 – 2.29 (m, 1H), 2.16 – 2.04 (m, 4H), 2.01 (s, 1H), 1.73 – 1.56 (m, 3H), 1.49 – 1.36 (m, 1H), 1.40 – 1.29 (m, 5H), 1.28 (s, 7H), 1.14 – 0.95 (m, 1H), 0.95 – 0.79 (m, 3H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 179.30, 179.25, 173.92, 139.94, 135.37, 135.24, 135.21, 131.96, 130.22, 130.03, 128.30, 128.26, 128.07, 127.91, 127.76, 127.12, 125.03, 124.95, 124.90, 124.53, 124.42, 124.39, 124.27, 124.24, 124.15, 123.00, 72.12, 68.38, 65.06, 59.01, 53.42, 39.88, 39.78, 39.74, 39.38, 37.44, 37.37, 37.31, 34.10, 33.98, 33.96, 32.81, 32.71, 32.22, 32.19, 32.00, 31.94, 31.92, 29.78, 29.72, 29.70, 29.68, 29.67, 29.65, 29.64, 29.62, 29.61, 29.59, 29.57, 29.45, 29.38, 29.36, 29.34, 29.29, 29.26, 29.19, 29.16, 29.13, 29.10, 29.09, 29.04, 27.99, 27.22, 27.19, 26.78, 26.69, 26.65, 26.41, 26.38, 25.70, 25.65, 25.64, 25.63, 25.54, 25.15, 24.88, 24.69, 24.48, 23.47, 23.44, 22.73, 22.71, 22.63, 20.56, 19.76, 19.72, 17.69, 16.18, 16.00, 14.28, 14.13, 14.08.

Os dados espectroscópicos são compatíveis com a presença de:

monooleína;

monolinoleína;

monopalmitoleína;

ésteres graxos de glicerol;

derivados de solketal associados a ácidos graxos.

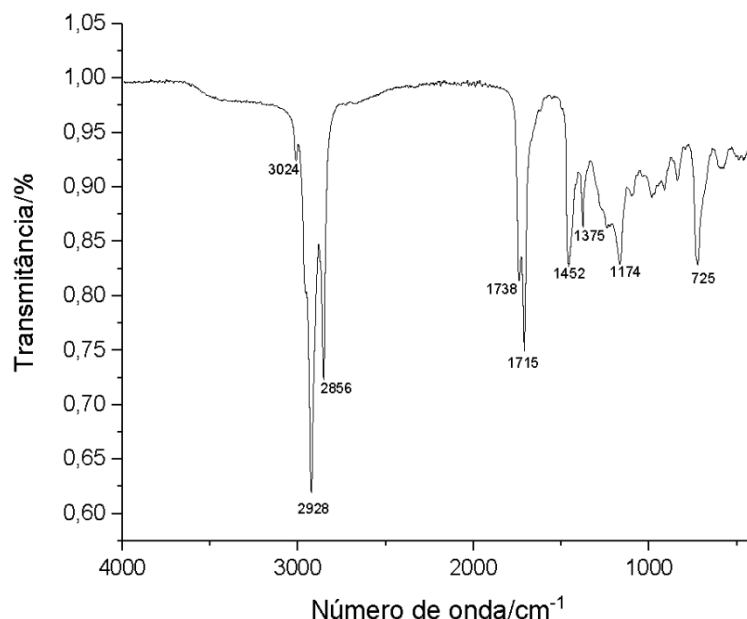


Figura B2. Espectro de FTIR da fração 10–35 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*.

Fração 36-57

Identificação química: ácidos graxos, ésteres graxos, monoacilgliceróis, lactonas terpênicas e derivados oxigenados de terpenos.

Constituintes identificados por CG-EM: ácidos graxos e ésteres graxos.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.45 – 5.33 (m, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.19 – 5.09 (m, 1H), 4.24 – 4.07 (m, 1H), 2.81 (dt, $J = 14.3, 6.3$ Hz, 1H), 2.41 – 2.29 (m, 1H), 2.16 – 2.04 (m, 4H), 2.01 (s, 1H), 1.73 – 1.56 (m, 3H), 1.49 – 1.36 (m, 1H), 1.40 – 1.29 (m, 5H), 1.28 (s, 7H), 1.14 – 0.95 (m, 1H), 0.95 – 0.79 (m, 3H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 179.30, 179.25, 173.92, 139.94, 135.37, 135.24, 135.21, 131.96, 130.22, 130.03, 128.30, 128.26, 128.07, 127.91, 127.76, 127.12, 125.03, 124.95, 124.90, 124.53, 124.42, 124.39, 124.27, 124.24, 124.15, 123.00, 72.12, 68.38, 65.06, 59.01, 53.42, 39.88, 39.78, 39.74, 39.38, 37.44, 37.37, 37.31, 34.10, 33.98, 33.96, 32.81, 32.71, 32.22, 32.19, 32.00, 31.94, 31.92, 29.78, 29.72, 29.70, 29.68, 29.67, 29.65, 29.64, 29.62, 29.61, 29.59, 29.57, 29.45, 29.38, 29.36, 29.34, 29.29, 29.26, 29.19, 29.16, 29.13, 29.10, 29.09, 29.04, 27.99, 27.22, 27.19, 26.78, 26.69, 26.65, 26.41, 26.38, 25.70, 25.65, 25.64, 25.63, 25.54, 25.15, 24.88, 24.69,

24.48, 23.47, 23.44, 22.73, 22.71, 22.63, 20.56, 19.76, 19.72, 17.69, 16.18, 16.00, 14.28, 14.13, 14.08.

Os dados espectroscópicos apresentam características compatíveis com:

grupos carbonila associados a ácidos e/ou ésteres;

carbonos oxigenados;

presença de insaturações;

predominância de carbonos alifáticos.

Em conjunto, os dados são compatíveis com a presença de:

ésteres de ácidos graxos;

monoacilgliceróis;

lactonas terpênicas;

derivados oxigenados de terpenos.

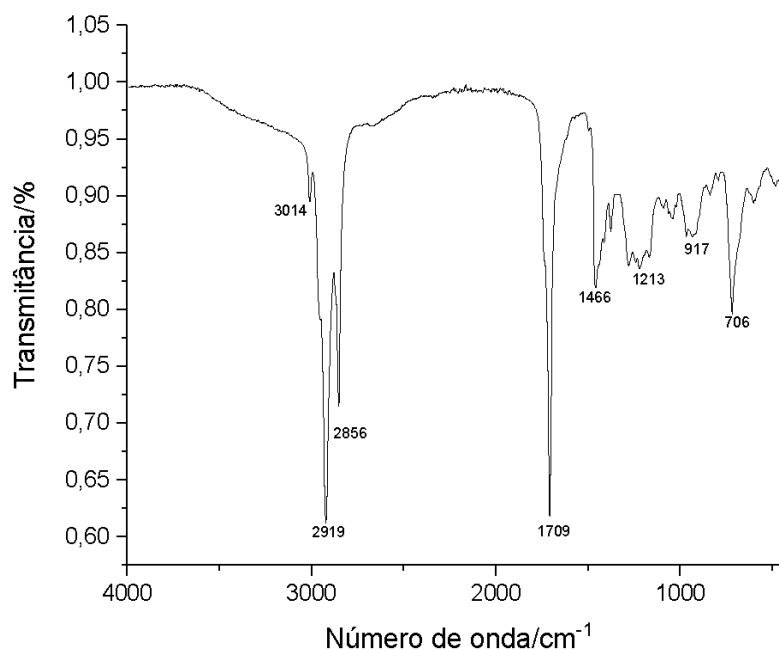


Figura B3. Espectro de FTIR da fração 36–57 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*.

Fração 58-137

Identificação química: 4-benzyloxy-2-methylpyridine 1-oxide e ácidos graxos.

Constituintes identificados por CG-EM: 4-benzyloxy-2-methylpyridine 1-oxide e ácidos graxos.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35 – 7.21 (m, 1H), 7.05 – 6.95 (m, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.66 – 5.51 (m, 1H), 5.45 – 5.31 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.59 (s, 1H), 4.02 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.82 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.41 – 2.29 (m, 2H), 2.33 (s, 1H), 2.08 (s, 5H), 2.14 – 2.00 (m, 5H), 1.70 (s, 3H), 1.69 – 1.55 (m, 7H), 1.33 (s, 17H), 1.28 (s, 17H), 1.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 0.88 (dtd, $J = 13.6, 7.0, 3.7$ Hz, 6H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 179.82, 131.98, 128.77, 128.30, 127.76, 127.42, 127.13, 126.11, 124.30, 110.78, 77.23, 56.66, 48.55, 39.74, 33.76, 32.22, 31.94, 29.71, 29.67, 29.50, 29.37, 29.26, 29.09, 27.21, 26.42, 25.63, 25.54, 24.71, 23.45, 22.70, 20.56, 14.29, 14.13.

Os dados espectroscópicos são compatíveis com a presença de um composto contendo grupo benzila ligado a oxigênio ($\text{PhCH}_2\text{O}-$), função carbonila e sistema insaturado. A estrutura pode estar associada a um derivado terpênico benzilado, embora a classificação específica como monoterpene, sesquiterpene ou diterpene não possa ser estabelecida apenas com os dados apresentados.

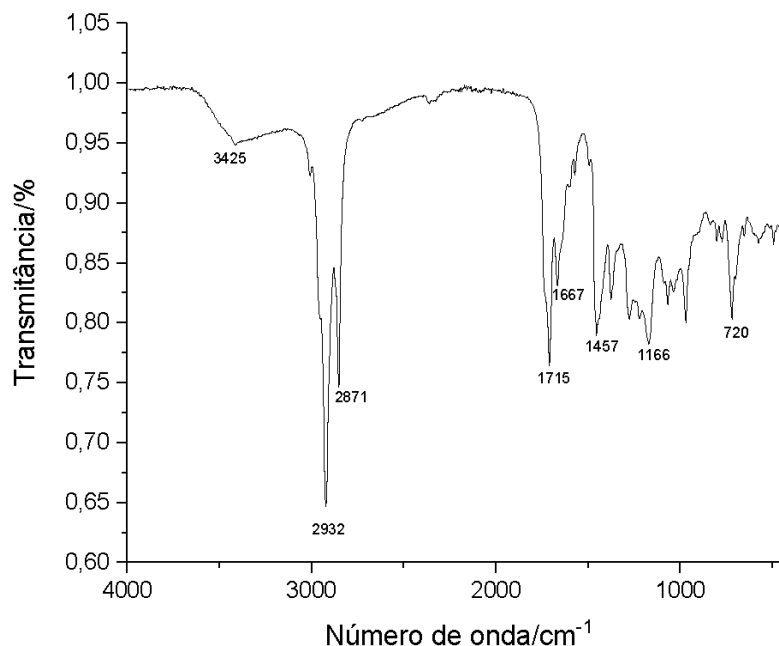


Figura B4. Espectro de FTIR da fração 58–137 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*.

Fração 138–159

Identificação química: ácidos graxos, ésteres graxos, triacilgliceróis, monoacilgliceróis e diacilgliceróis.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.21 – 6.11 (m, 2H), 5.39 (dddd, $J = 9.5, 8.0, 3.8, 2.2$ Hz, 4H), 5.17 – 5.09 (m, 2H), 4.32 – 4.11 (m, 3H), 3.77 – 3.57 (m, 3H), 2.80 (dq, $J = 12.2, 6.2$ Hz, 3H), 2.36 (td, $J = 7.6, 5.4$ Hz, 8H), 2.07 (h, $J = 7.8$ Hz, 13H), 1.99 (d, $J = 2.8$ Hz, 4H), 1.72 – 1.56 (m, 14H), 1.43 – 1.21 (m, 54H), 1.09 (s, 2H), 1.07 – 0.79 (m, 14H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174.40, 174.35, 138.51, 138.04, 137.77, 137.57, 135.87, 135.24, 134.88, 132.93, 132.59, 131.98, 131.32, 130.83, 130.25, 130.03, 129.27, 128.71, 128.56, 128.31, 128.25, 128.09, 127.91, 127.81, 127.12, 125.91, 124.95, 124.43, 123.73, 77.24, 72.94, 72.17, 70.29, 65.98, 65.17, 63.34, 48.38, 42.51, 39.74, 37.26, 37.13, 34.17, 34.15, 34.05, 33.82, 31.93, 31.54, 30.27, 29.71, 29.67, 29.60, 29.46, 29.37, 29.35, 29.30, 29.26, 29.16, 29.14, 29.10, 28.97, 28.82, 28.74, 27.21, 27.19, 26.68, 26.41, 25.64, 25.54, 25.32, 24.92, 24.90, 24.69, 23.45, 22.88, 22.70, 22.58, 21.63, 20.76, 20.56, 16.03, 14.29, 14.21, 14.13, 14.09, 13.12, 12.83, 12.76.

Os dados espectroscópicos são compatíveis com a presença de:

triacilgliceróis;

monoacilgliceróis;

diacilgliceróis;

ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos.

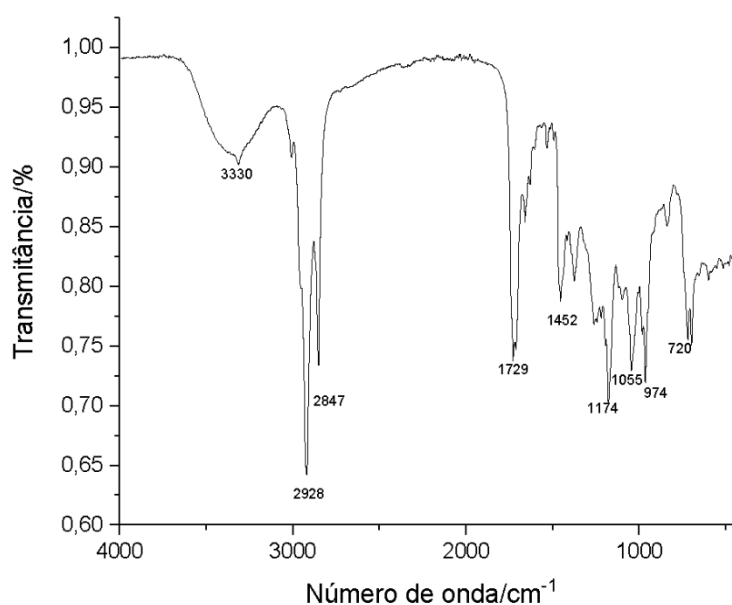


Figura B6. Espectro de FTIR da fração 138–159 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*.

Fração 160–215

Constituintes identificados por CG-EM: hidrocarbonetos graxos.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39 – 7.23 (m, 1H), 6.94 – 6.81 (m, 1H), 5.47 – 5.38 (m, 1H), 5.42 – 5.33 (m, 4H), 5.37 – 5.25 (m, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.50 – 4.14 (m, 3H), 4.04 – 3.86 (m, 1H), 3.77 – 3.52 (m, 2H), 3.52 – 3.34 (m, 1H), 2.82 (s, 3H), 2.86 – 2.75 (m, 2H), 2.36 (td, $J = 7.5, 3.2$ Hz, 3H), 2.35 – 2.26 (m, 1H), 2.09 (dp, $J = 13.6, 6.3$ Hz, 6H), 2.06 – 1.95 (m, 1H), 1.70 (s, 1H), 1.68 – 1.52 (m, 6H), 1.49 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 1.42 – 1.35 (m, 1H), 1.38 – 1.20 (m, 17H), 1.27 (s, 13H), 1.22 – 1.04 (m, 1H), 1.07 – 0.78 (m, 11H), 0.70 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 140.29, 132.51, 131.98, 130.25, 130.23, 130.03, 128.72, 128.32, 128.24, 128.09, 127.91, 127.78, 127.35, 127.12, 122.17, 115.35, 103.59, 101.18, 77.24, 73.90, 73.61, 73.10, 72.40, 71.59, 70.29, 65.15, 63.35, 62.37, 56.76, 55.98, 50.17, 45.84, 42.33, 39.76, 38.87, 37.27, 36.73, 36.15, 34.26, 34.15, 31.94, 31.87, 31.53, 29.74, 29.71, 29.61, 29.37, 29.35, 29.21, 29.15, 29.10, 29.06, 27.21, 26.09, 25.63, 25.54, 24.89, 24.30, 23.07, 22.70, 22.58, 21.08, 20.56, 19.83, 19.35, 19.04, 18.79, 14.29, 14.13, 14.09, 11.99, 11.86.

Os dados espectroscópicos apresentam:

sinais atribuídos a carbonos anoméricos (~101–104 ppm);

diversos carbonos oxigenados (62–74 ppm);

cadeia alifática longa;

múltiplas insaturações.

Em conjunto, essas características são compatíveis com a presença de glicolipídios, incluindo possíveis:

monogalactosildiacilgliceróis (MGDG);

digalactosildiacilgliceróis (DGDG);

outros glicolipídios vegetais.

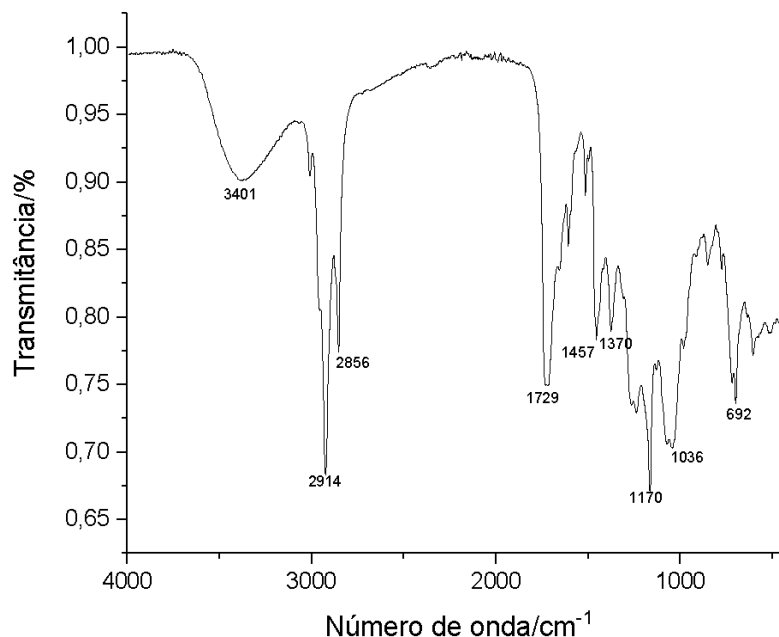


Figura B8. Cromatograma de CG-EM da fração 160–215 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*, com identificação dos principais constituintes químicos.

Fração 216-272

Identificação por CG-EM: foram observados dois constituintes com baixa similaridade com a biblioteca espectral, cujos espectros apresentaram similaridade com compostos descritos como 1-(3-isopropylidene-5,5-dimethyl-bicyclo[2.1.0]pent-2-yl)-ethanone e N-[(1E,3E)-3-(phenylimino)-1-propenyl]aniline. Dessa forma, os resultados sugerem a presença de compostos estruturalmente relacionados a essas referências, sem permitir sua identificação definitiva.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.31 (m, 3H), 7.34 – 7.24 (m, 3H), 5.38 (p, $J = 10.4$ Hz, 7H), 2.40 – 2.27 (m, 6H), 2.08 (dt, $J = 13.6, 7.3$ Hz, 10H), 2.00 (s, 6H), 1.67 – 1.57 (m, 15H), 1.30 (d, $J = 19.6$ Hz, 69H), 1.04 – 0.78 (m, 16H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 146.61, 131.98, 130.26, 129.37, 129.18, 128.83, 128.79, 128.63, 128.32, 128.25, 127.84, 127.78, 127.22, 127.12, 126.49, 116.02, 114.29, 113.22, 86.61, 77.25, 65.03, 49.73, 47.83, 42.32, 35.07, 31.93, 29.91, 29.71, 29.66, 29.37, 29.10, 27.21, 25.63, 25.55, 25.06, 22.70, 22.58, 20.56, 14.29, 14.13.

Os dados espectroscópicos são compatíveis com:

um anel benzênico substituído; ou

uma mistura de compostos aromáticos relacionados.

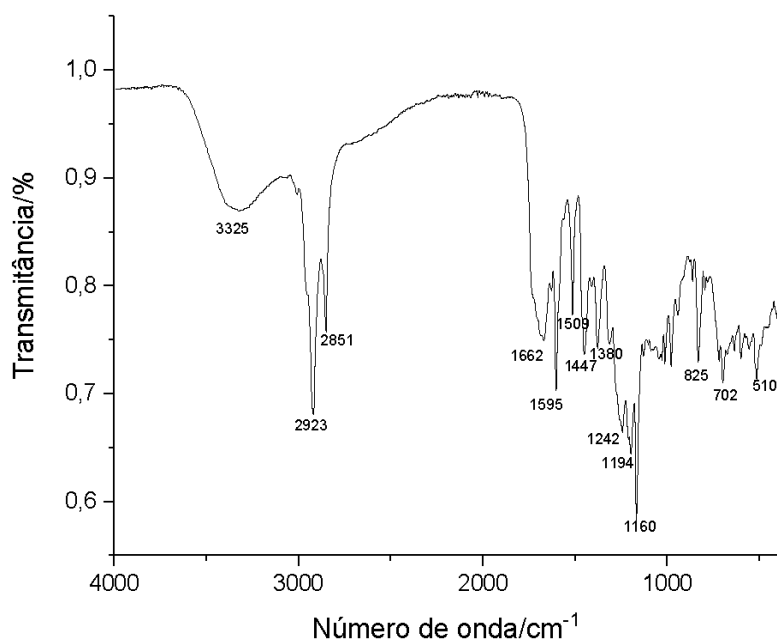


Figura B8. Espectro de FTIR da fração 216–272 do extrato de metanol de *Tropaeolum majus*.

APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO DE BUTAN-1-OL

Tabela 3. Frações obtidas da coluna de butan-1-ol de *Tropaeolum majus* e respectivas técnicas de caracterização e principais identificações químicas.

Fração	Técnicas de caracterização	Principais compostos/identificação
7–11	RMN, IV, CG-EM	Ésteres graxos (ácido linoleico/oleico)
12–57	RMN, IV, CG-EM	Ácido palmítico e ácido linolênico
58–71	RMN, IV	Diacilglicerídeo de ácido linoleico/oleico
72–82	RMN, IV, CG-EM	Acrilato de laurila
83–108	RMN, IV	Monolinoleína/Monooleína
109–142	RMN, IV	Glicosídeo acetilado de ácido graxo
143–227	RMN, IV	Derivado de glicerol/açúcar
228–292	RMN, IV, CG-EM	γ - e β -sitosterol

Nota: IV = espectroscopia no infravermelho; RMN = ressonância magnética nuclear; CG-EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; — = informação não disponível ou não indicada para a fração.

Fração 7-11

Identificação química: ésteres graxos associados aos ácidos linoleico e oleico.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (s, 1H), 5.45 – 5.31 (m, 1H), 5.31 (s, 2H), 5.14 (q, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.35 – 4.23 (m, 1H), 2.81 (ddt, $J = 14.7, 7.9, 4.6$ Hz, 1H), 2.42 – 2.27 (m, 1H), 2.16 – 1.96 (m, 3H), 1.81 – 1.57 (m, 3H), 1.50 (tdd, $J = 7.9, 6.4, 1.9$ Hz, 1H), 1.47 – 1.27 (m, 10H), 1.28 (s, 5H), 1.06 – 0.77 (m, 6H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 178.57, 165.98, 135.23, 134.25, 131.96, 130.25, 130.23, 130.02, 129.50, 128.29, 128.26, 128.07, 127.91, 127.76, 127.12, 125.04, 124.27, 77.24, 67.78, 62.12, 53.42, 39.78, 39.74, 39.38, 38.92, 37.46, 37.31, 36.64, 34.41, 33.88, 33.86, 32.76, 32.22, 31.94, 31.91, 31.54, 30.58, 29.71, 29.67, 29.60, 29.45, 29.38, 29.36, 29.26, 29.19, 29.16, 29.13, 29.09, 29.05, 29.00, 27.21, 26.69, 26.42, 25.70, 25.63, 25.54, 25.01, 24.88, 24.73, 24.71, 24.00, 23.44, 22.98, 22.70, 22.63, 22.58, 20.56, 19.72, 16.00, 14.28, 14.12, 14.07, 14.04, 12.10, 11.09.

Os espectros de RMN indicam uma fração constituída majoritariamente por cadeias alifáticas longas, contendo insaturações e grupos oxigenados. Em conjunto com os dados de FTIR, essas características são compatíveis com a presença de ésteres graxos associados aos ácidos linoleico e oleico.

Principais bandas observadas no FTIR

2960, 2914 e 2852 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ associados a grupos alifáticos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-$;

1720 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com grupo carbonila de éster;

1266 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C-O})$, compatível com função éster.

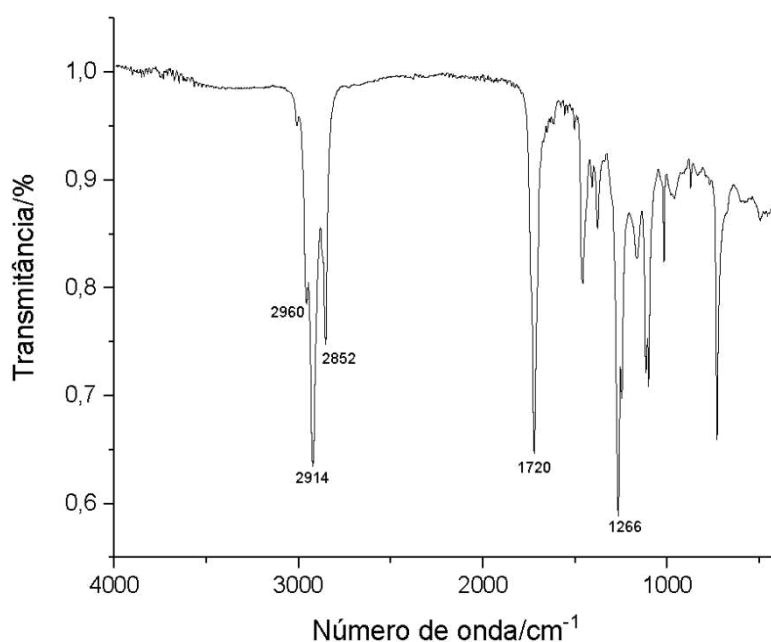


Figura C1. Espectro de FTIR da fração 7–11 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 12-57

Identificação química: mistura de ácidos graxos, com identificação por CG-EM de ácido palmítico e ácido linolênico.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.48 – 5.28 (m, 2H), 2.87 – 2.76 (m, 1H), 2.41 – 2.27 (m, 1H), 2.16 – 2.06 (m, 1H), 2.09 – 1.99 (m, 1H), 1.81 – 1.57 (m, 2H), 1.55 – 1.34 (m, 1H), 1.36 – 1.27 (m, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.06 – 0.77 (m, 3H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 179.72, 179.66, 166.00, 134.25, 131.97, 130.26, 130.23, 130.03, 129.93, 129.50, 128.36, 128.30, 128.26, 128.17, 128.08, 128.01, 127.91, 127.76, 127.13, 77.23, 67.80, 53.43, 50.14, 39.78, 38.92, 37.25, 34.02, 34.00, 33.96, 32.76, 32.22, 31.94, 31.91, 31.54, 30.58, 30.05, 29.71, 29.68, 29.65, 29.60, 29.57, 29.45, 29.37, 29.36, 29.33, 29.25, 29.15, 29.08, 29.04, 29.00, 28.71, 27.21, 27.02, 26.42, 25.63, 25.54, 24.70, 24.68, 24.59, 24.00, 23.44, 22.98, 22.70, 22.59, 21.09, 20.56, 19.83, 19.72, 19.40, 19.04, 14.28, 14.13, 14.08, 14.05, 11.10.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicam uma fração rica em cadeias alifáticas longas, contendo insaturações e grupos carboxílicos e/ou ésteres, características compatíveis com constituintes de ceras e cutículas vegetais. Em conjunto com os dados de CG-EM, os resultados são compatíveis com uma mistura de ácidos graxos, incluindo ácido palmítico e ácido linolênico.

3. Principais bandas observadas no FTIR

3029 cm^{-1} : estiramento $=\text{C}-\text{H}$, associado a hidrogênios vinílicos, indicando a presença de insaturações ($\text{C}=\text{C}$);

2958, 2932 e 2852 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C}-\text{H})$ de grupos CH_3 e CH_2 alifáticos, compatíveis com cadeias hidrocarbônicas longas;

1701 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$, compatível com carbonila de ácido carboxílico;

1452 cm^{-1} : deformação $\delta(\text{CH}_2)$, associada a cadeias alifáticas longas;

1270 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C}-\text{O})$, compatível com grupo carboxílico;

740 cm^{-1} : vibração de *rocking* de $(\text{CH}_2)_n$, compatível com cadeias alifáticas longas e lineares.

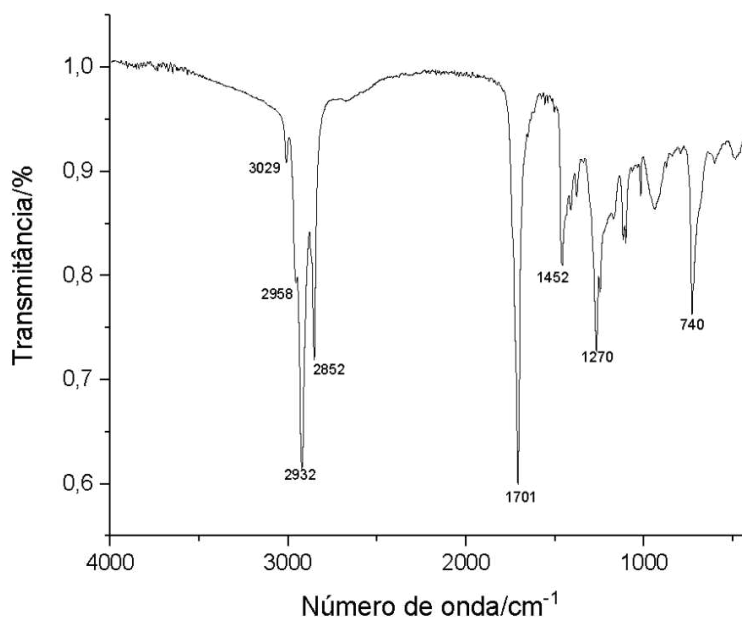


Figura C2. Espectro de FTIR da fração 12–57 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 58-71

Principais bandas observadas no FTIR

3397 cm^{-1} : banda larga de $\nu(\text{O-H})$, compatível com grupos hidroxila, incluindo possível contribuição de ácido carboxílico;

2928 e 2861 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, compatíveis com cadeias hidrocarbônicas longas;

1739 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de éster;

1715 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de ácido carboxílico;

1457 cm^{-1} : deformação $\delta(\text{CH}_2)$, associada a cadeias alifáticas longas;

1171 e 1027 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-O})$, compatíveis com função éster;

712 cm^{-1} : vibração de *rocking* de $(\text{CH}_2)_n$, compatível com cadeias alifáticas longas e lineares.

A presença simultânea das bandas em 1739 e 1715 cm^{-1} é compatível com a ocorrência de diferentes tipos de grupos carbonila, associados, respectivamente, a ésteres e ácidos carboxílicos. A banda em 3397 cm^{-1} também é compatível com a presença de grupos O-H. Em conjunto, essas características sugerem uma mistura contendo ésteres alifáticos de ácidos graxos e ácidos graxos livres, ambos com cadeias alifáticas longas.

A presença de diferentes funções químicas pode ser representada por:

R-COO-R' : função éster;

R-COOH: função ácido carboxílico.

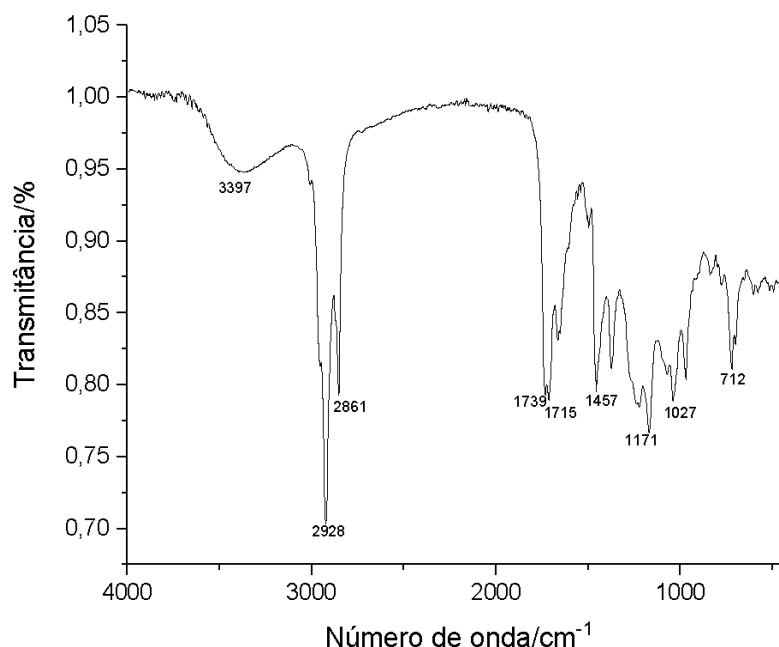


Figura C3. Espectro de FTIR da fração 58–71 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 72-82

Identificação química: acrilato de laurila e 4-benzyloxy-2-methylpyridine 1-oxide, identificados por CG-EM.

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinal em δ 9,585, compatível com hidrogênio aldeídico, além de sinais na região aromática e de múltiplas insaturações. Em conjunto, esses sinais são compatíveis com constituintes contendo estruturas aromáticas conjugadas e cadeias alifáticas insaturadas.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.585 (s, 1H), 7.35 – 7.21 (m, 1H), 7.05 – 6.95 (m, 1H), 6.62 – 6.49 (m, 1H), 6.42 – 6.25 (m, 1H), 6.21 – 6.11 (m, 1H), 5.98 (dt, J = 12.9, 11.0 Hz, 1H), 5.81 – 5.64 (m, 1H), 5.40 (dddd, J = 14.4, 12.2, 8.5, 6.8, 1.9 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 4.33 – 4.22 (m, 1H), 4.26 – 4.09 (m, 1H), 4.05 – 3.86 (m, 1H), 3.76 – 3.57 (m, 1H), 2.83 (s, 1H), 2.88 – 2.69 (m, 1H), 2.36 (td, J = 7.3, 4.2 Hz, 3H), 2.29 – 2.15 (m, 1H), 2.15 – 1.97 (m, 4H), 1.78 (d, J = 18.1 Hz, 1H), 1.70 (s, 1H), 1.71 – 1.53 (m, 7H), 1.34 (h, J = 8.7 Hz, 14H), 1.28 (s, 17H), 1.09 (s, 1H), 1.06 – 0.79 (m, 9H).

2. Principais bandas observadas no FTIR

3378 cm^{-1} : banda larga de $\nu(\text{O-H})$, compatível com a presença de grupos hidroxila;
 2914 e 2857 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, compatíveis com cadeias hidrocarbônicas longas;
 1733–1724 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de éster;
 1643 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=C})$, indicando a presença de insaturações;
 1462 cm^{-1} : deformação $\delta(\text{CH}_2)$, associada a cadeias alifáticas longas;
 1185 e 1027 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-O})$, compatíveis com função éster;
 730 cm^{-1} : vibração de *rocking* de $(\text{CH}_2)_n$, compatível com cadeias alifáticas longas e lineares.
 O perfil espectroscópico é compatível com uma fração rica em ésteres graxos insaturados, podendo apresentar também contribuição de ácidos graxos livres. As características observadas são compatíveis com a presença de constituintes de maior caráter alifático e com possível coeluição de componentes da fração.

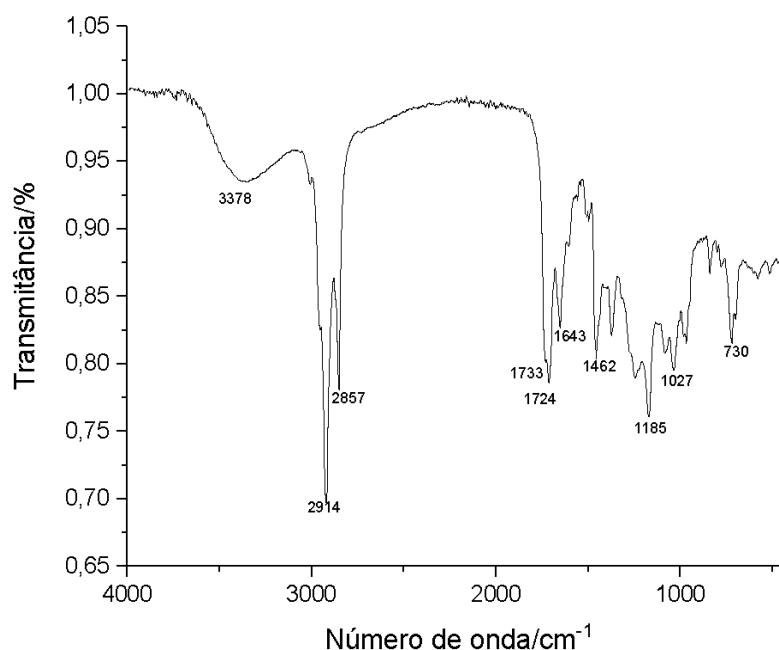


Figura C4. Espectro de FTIR da fração 72–82 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 83–108

Identificação química: principalmente 1-monolinoleína (glicerol-1-monolinoleato) ou 1-monooleína, possivelmente em mistura com isômeros de monoacilgliceróis (2-MAG) e pequenas quantidades de diacilgliceróis.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.42 (s, 1H), 5.45 – 5.31 (m, 1H), 4.33 – 4.10 (m, 1H), 4.05 – 3.89 (m, 0H), 3.78 – 3.58 (m, 1H), 2.81 (dt, $J = 14.4, 6.3$ Hz, 1H), 2.37 (td, $J = 7.5, 4.3$ Hz, 1H), 2.16 – 2.06 (m, 1H), 2.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.72 – 1.57 (m, 1H), 1.44 – 1.29 (m, 6H), 1.28 (s, 5H), 1.11 (s, 3H), 1.05 – 0.80 (m, 3H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174.36, 131.99, 130.25, 130.03, 128.31, 128.26, 127.91, 127.78, 127.12, 77.23, 70.29, 65.18, 63.34, 34.17, 34.15, 31.93, 29.71, 29.68, 29.66, 29.61, 29.59, 29.57, 29.46, 29.37, 29.35, 29.25, 29.15, 29.14, 29.09, 28.95, 27.22, 25.64, 25.63, 25.54, 24.92, 24.90, 22.70, 20.56, 14.29, 14.13.

3. Interpretação dos dados de RMN

Os espectros de RMN indicam a presença de um éster graxo contendo cadeia alifática longa e insaturada, associado a um fragmento poliol com três carbonos oxigenados, compatível com constituintes do tipo monoacilglicerídeos, além da presença de unidade aromática não esterificada.

4. Principais bandas observadas no FTIR

3358 cm^{-1} : banda larga de $\nu(\text{O-H})$, compatível com a presença de grupos hidroxila;
 2924 e 2852 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, compatíveis com cadeias hidrocarbônicas longas;
 1734 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de éster;
 1710 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de ácido carboxílico;
 1652 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=C})$, indicando a presença de insaturação;
 1462 cm^{-1} : deformação $\delta(\text{CH}_2)$, associada a cadeias alifáticas longas;
 1171 e 1050 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-O})$, compatíveis com função éster;
 712 cm^{-1} : vibração de *rocking* de $(\text{CH}_2)_n$, compatível com cadeias alifáticas longas e lineares.

5. FTIR

O espectro apresenta bandas compatíveis com a presença simultânea de funções éster e ácido carboxílico, além de insaturações e cadeias alifáticas longas. Em conjunto, os dados são compatíveis com uma fração mista contendo ésteres de ácidos graxos insaturados e ácidos graxos insaturados livres.

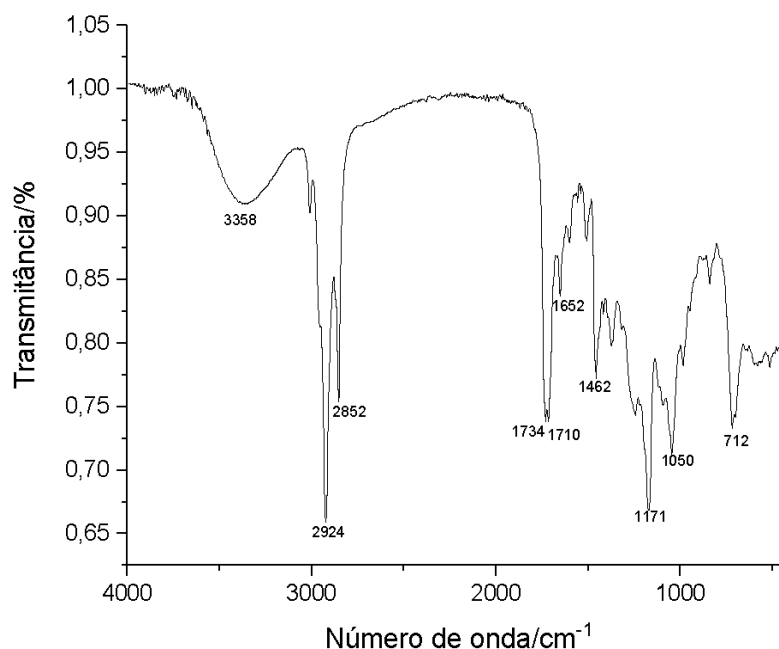


Figura C5. Espectro de FTIR da fração 83–108 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 109–142

Identificação química: mistura complexa de constituintes altamente oxigenados, com características compatíveis com derivados de açúcares e/ou polióis esterificados por ácidos graxos e compostos fenólicos, incluindo possíveis grupos acetila. A amostra foi descrita como contendo majoritariamente um glicosídeo acetilado de ácido graxo.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.91 – 6.79 (m, 1H), 5.43 – 5.29 (m, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.42 – 4.29 (m, 1H), 4.29 – 4.04 (m, 5H), 3.80 – 3.65 (m, 1H), 3.68 – 3.52 (m, 1H), 3.52 – 3.32 (m, 1H), 2.85 – 2.74 (m, 1H), 2.33 (dq, $J = 9.1, 6.4$ Hz, 2H), 2.11 (s, 5H), 2.14 – 2.04 (m, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.07 – 1.89 (m, 1H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.49 (s, 0H), 1.44 – 1.09 (m, 10H), 1.26 (s, 7H), 1.09 – 0.77 (m, 6H), 0.69 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H).

2. Dados de RMN de ^{13}C

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174.53, 174.40, 171.27, 171.17, 170.85, 170.13, 161.33, 140.29, 132.44, 132.00, 131.97, 130.24, 130.22, 130.02, 129.37, 128.61, 128.30, 128.24, 127.76, 127.21, 127.12, 122.13, 115.99, 115.35, 112.79, 101.16, 79.66, 77.26, 76.22, 73.80, 73.55, 72.30, 70.31, 70.25, 68.03, 66.68, 65.20, 65.10, 63.50, 63.35, 62.39, 61.26, 56.74, 56.09, 50.15, 45.82, 45.53, 42.32, 41.04, 39.75, 38.83, 37.26, 36.70, 36.15, 34.28, 34.14, 33.94, 31.93, 31.85, 31.52, 30.56, 29.75, 29.70, 29.65, 29.60, 29.37, 29.24, 29.15, 29.09, 28.24, 27.20, 26.94, 26.45,

26.09, 25.61, 25.53, 24.96, 24.87, 24.28, 23.06, 22.96, 22.69, 21.06, 21.01, 20.80, 20.76, 20.55, 19.82, 19.33, 19.03, 18.78, 14.28, 14.12, 13.68, 11.98, 11.85.

3. Interpretação dos dados de RMN

Os espectros de RMN indicam uma fração constituída por uma mistura de compostos oxigenados, apresentando múltiplos sinais de carbonila, carbonos oxigenados, sinais associados a estruturas aromáticas e cadeias alifáticas. Essas características são compatíveis com derivados de açúcares e/ou polióis esterificados por ácidos graxos, além de possíveis componentes fenólicos e grupos acetila.

4. Principais bandas observadas no FTIR

3387 cm^{-1} : banda larga de $\nu(\text{O-H})$, compatível com a presença de grupos hidroxila;

2928 e 2847 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, associados a cadeias hidrocarbônicas;

1715 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de ácido carboxílico;

1614 e 1518 cm^{-1} : bandas associadas a vibrações $\nu(\text{C=C})$, indicando a presença de estruturas insaturadas;

1371 cm^{-1} : deformação de $\delta(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$;

1227 e 1050 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-O})$, compatíveis com grupos oxigenados;

597 cm^{-1} : banda na região de deformação fora do plano, sem caráter diagnóstico específico.

5. Interpretação do FTIR

Em conjunto, o espectro de FTIR apresenta características compatíveis com a presença de grupos hidroxila, carbonila, estruturas insaturadas e cadeias alifáticas. A banda em 1715 cm^{-1} é compatível com carbonila de ácido carboxílico, enquanto as bandas em 1614 e 1518 cm^{-1} indicam a presença de estruturas insaturadas. Esses dados são compatíveis com a contribuição de ácidos carboxílicos alifáticos insaturados de cadeia longa, incluindo possíveis ácidos graxos livres.

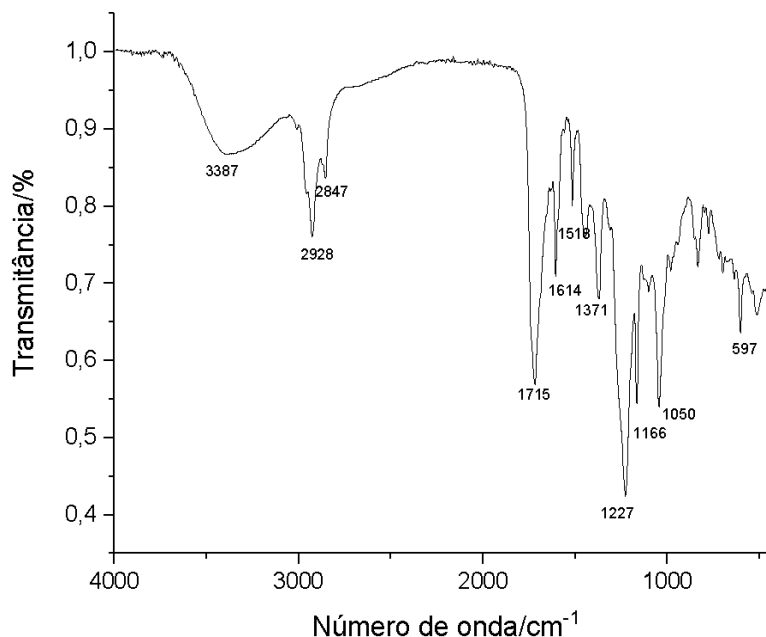


Figura C6. Espectro de FTIR da fração 109–142 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 143–227

Identificação química: derivado de glicerol e/ou açúcar contendo grupos hidroxila, associado a cadeias alifáticas longas. Os dados de RMN são compatíveis com uma mistura de compostos oxigenados, incluindo possíveis derivados de açúcares e/ou polióis esterificados por ácidos graxos.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.45 – 5.32 (m, 2H), 4.55 – 4.37 (m, 2H), 4.01 – 3.89 (m, 2H), 3.68 – 3.54 (m, 2H), 3.54 – 3.35 (m, 2H), 2.82 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.36 (ddd, $J = 7.6, 6.2, 1.9$ Hz, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.16 – 2.07 (m, 2H), 2.06 (ddd, $J = 7.9, 4.1, 2.1$ Hz, 3H), 2.06 – 1.94 (m, 2H), 1.66 – 1.58 (m, 3H), 1.32 (dt, $J = 6.6, 4.1$ Hz, 8H), 1.28 (s, 47H), 1.24 (s, 3H), 1.26 – 1.13 (m, 2H), 1.10 – 0.91 (m, 7H), 0.94 – 0.86 (m, 14H), 0.90 – 0.75 (m, 13H), 0.82 (s, 27H).

2. Interpretação dos dados de RMN

Os espectros de RMN indicam uma fração constituída por compostos oxigenados, apresentando sinais associados a grupos hidroxila e cadeias alifáticas longas. Esses dados são compatíveis com estruturas derivadas de glicerol e/ou açúcares contendo múltiplos grupos hidroxila.

3. Principais bandas observadas no FTIR

3349 cm^{-1} : banda larga de $\nu(\text{O-H})$, compatível com grupos hidroxila associados por ligações de hidrogênio;

2932 e 2857 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, compatíveis com cadeias hidrocarbônicas longas;

1691 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com carbonila de ácido carboxílico;

1466 cm^{-1} : deformação $\delta(\text{CH}_2)$, associada a cadeias alifáticas;

1160 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C-O})$, compatível com grupos oxigenados;

716 cm^{-1} : vibração de *rocking* de $(\text{CH}_2)_n$, compatível com cadeias alifáticas longas e lineares.

4. FTIR

O conjunto das bandas observadas é compatível com a presença de grupos hidroxila, carbonila e cadeias alifáticas longas. A banda em 1691 cm^{-1} é compatível com grupo carbonila de ácido carboxílico, enquanto a ausência de uma banda intensa na região típica de carbonila de éster ($\sim 1735\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$) não fornece evidência de predominância de ésteres nesta fração. Em conjunto, os dados de FTIR são compatíveis com a presença de ácidos carboxílicos alifáticos de cadeia longa, incluindo possíveis ácidos graxos livres. A presença de insaturações não pode ser estabelecida com segurança apenas a partir deste espectro.

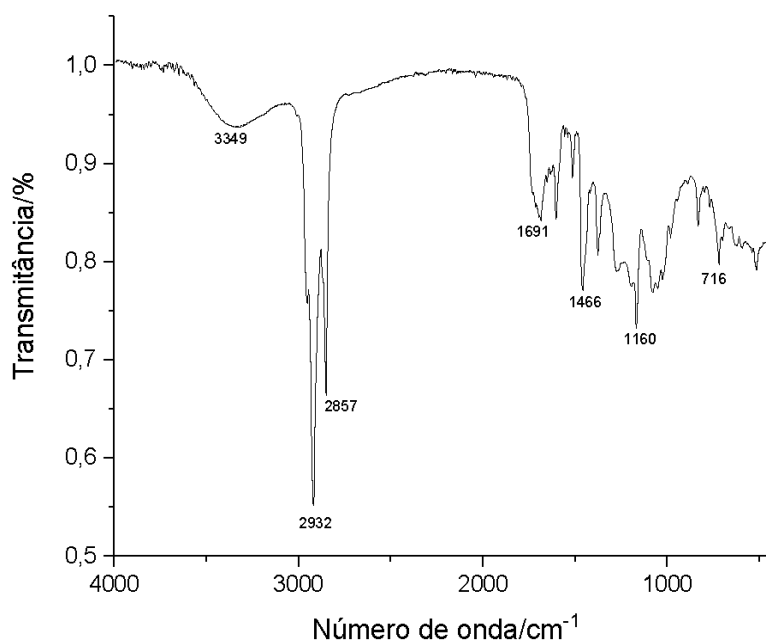


Figura C7. Espectro de FTIR da fração 143–227 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.

Fração 228-292

Identificação química: fitosteróis, com identificação por CG-EM de γ -sitosterol e β -sitosterol.

1. Dados de RMN de ^1H

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.38 (dp, $J = 14.9, 4.8$ Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 2.40 – 2.21 (m, 1H), 2.16 – 1.97 (m, 2H), 1.62 (dd, $J = 12.8, 6.2$ Hz, 1H), 1.37 – 1.29 (m, 4H), 1.27 (s, 27H), 1.33 – 1.20 (m, 15H), 1.13 – 0.93 (m, 3H), 0.88 (dtd, $J = 12.4, 6.7, 2.9$ Hz, 9H), 0.82 (s, 3H).

2. Interpretação dos dados de RMN

O espectro de RMN de ^1H indica uma fração rica em estruturas alifáticas, apresentando sinal associado a insaturação e sinal em δ 3,95 compatível com carbono ligado a oxigênio. Em conjunto com os dados de CG-EM, os resultados são compatíveis com a presença de fitosteróis, incluindo γ -sitosterol e β -sitosterol.

3. Principais bandas observadas no FTIR

3334 cm^{-1} : banda larga de $\nu(\text{O-H})$, compatível com a presença de grupos hidroxila;

2914 e 2852 cm^{-1} : estiramentos $\nu(\text{C-H})$ de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, compatíveis com estruturas de cadeia longa;

1709 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C=O})$, compatível com grupo carbonila;

1643 e 1614 cm^{-1} : bandas associadas a $\nu(\text{C=C})$, indicando a presença de insaturações;

1064 cm^{-1} : estiramento $\nu(\text{C-O})$, associado a grupos oxigenados;

720 cm^{-1} : vibração de *rocking* de $(\text{CH}_2)_n$, compatível com cadeias alifáticas longas.

4. FTIR

O espectro apresenta bandas compatíveis com grupos hidroxila, estruturas alifáticas de cadeia longa, grupos oxigenados e insaturações. A presença de uma banda de O-H e de uma banda na região de C-O é compatível com estruturas contendo função hidroxila, enquanto as bandas em 1643 e 1614 cm^{-1} indicam a presença de insaturações. Em conjunto com os dados de RMN e CG-EM, o perfil é compatível com a presença de fitosteróis.

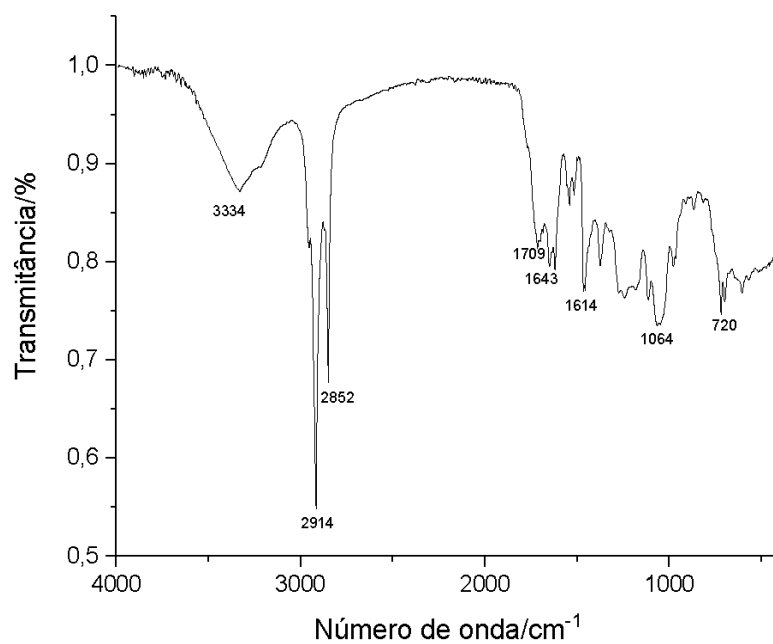


Figura C8. Espectro de FTIR da fração 228–292 do extrato de butan-1-ol de *Tropaeolum majus*.