

MYRIAM MARQUES RAMOS RIBEIRO

**ATIVIDADE FORMICIDA DE IB 151239 EM *Atta sexdens rubropilosa***

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*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

R484a  
2011

Ribeiro, Myriam Marques Ramos, 1982-  
Atividade formicida de IB 151239 em  
*Atta sexdens rubropilosa*/ Myriam Marques Ramos Ribeiro.  
- Viçosa, MG, 2011.  
x, 66f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Terezinha Maria Castro Della Lucia.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Formiga-cortadeira. 2. Toxidade. 3. Inseticidas vegetais.  
4. Produtos naturais. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.796

MYRIAM MARQUES RAMOS RIBEIRO

**ATIVIDADE FORMICIDA DE IB 151239 EM *Atta sexdens rubropilosa***

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: 04 de novembro de 2011.

---

Prof. Marcelo Coutinho Picanço  
(Co-orientador)

---

Prof. Raul Narciso C. Guedes  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Cidália Gabriela Santos Marinho

---

Dr. Sérgio Tinoco V. Magalhães

---

Prof<sup>ª</sup>. Terezinha Maria Castro Della Lucia  
(Orientadora)

A Deus pela minha vida e por ter me iluminado e me dado saúde para chegar até aqui.

**Agradeço**

Aos meus amados pais Alberino e Taís.

**Dedico**

A meu querido e eterno amor Guilherme.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial, ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade e condições oferecidas para a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

À Prof<sup>a</sup>.Terezinha Della Lucia pela orientação, confiança, amizade, exemplo profissional e pessoal, e por ter me apresentado o maravilhoso mundo das formigas;

Ao Prof. Raul N. C. Guedes pelas sugestões nos experimentos, por me atender sempre que precisei e por confiar em meu trabalho;

Ao Dr. Sérgio Magalhães, por ser o “químico de plantão” que me salvou nos momentos de desespero;

Aos queridos amigos José Milton, Gabriela e Marquinho pelos momentos engraçados, conselhos, e acima de tudo pela amizade;

Ao Sr. Manoel, pela amizade e auxílio em todas as horas;

Às minhas queridas amigas Bress, Karina, Lailla e Vanessinha, pelo companheirismo, pelas boas risadas, pela amizade sincera e pela enorme ajuda na realização deste trabalho;

Aos meus pais, Alberino e Taís, pelo exemplo de dignidade, força e coragem, pelo amor incondicional, pela amizade verdadeira, por toda dedicação e afeto e por terem me proporcionado chegar até aqui;

Ao meu marido Guilherme, meu grande amor, pelo companheirismo, amizade, dedicação, força, incentivo, coragem, paciência até mesmo nos momentos mais difíceis e por estar sempre ao meu lado nos momentos de que mais precisei;

Aos meus irmãos Adriana, Júlio, Júnior, Kátia, Maria José e Rodrigo pelo amor e por sempre acreditarem em mim;

Aos meus sobrinhos Gui, Luli, Bia, Teté, Hugo, Rafa, Geovanna, Camila, Kiki, Jéssyca (e Arthur), Lipe por me distraírem, me darem orgulho e me ouvirem, pelo menos em alguns momentos;

A Marlene, Afonso, Thiago e Nathália, pelo carinho, incentivo e por confiarem em mim;

A todos que participaram dos bons momentos que tive nessa jornada.

## BIOGRAFIA

MYRIAM MARQUES RAMOS RIBEIRO, filha de Alberino Venceslau Ribeiro e Taís Ramos Ribeiro, nasceu em Belo Horizonte, em 3 de setembro de 1982.

Em 2003 iniciou o Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais. Em agosto de 2003 iniciou um estágio em pesquisa no Laboratório de Formigas Cortadeiras/Entomologia – Departamento de Biologia Animal da UFV, onde foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq por dois anos consecutivos. De março de 2006 a agosto de 2006 foi monitora voluntária da disciplina de Entomologia Geral do Departamento de Biologia Animal da UFV. De agosto de 2006 a março de 2007 foi monitora oficial desta mesma disciplina.

Em março de 2007, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa e no mesmo mês e mesma Instituição iniciou o Curso de Mestrado continuando seus estudos com formigas cortadeiras. Terminou o Mestrado em 31 de outubro de 2008.

Em novembro de 2008, iniciou o Doutorado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, pesquisando sobre plantas tóxicas à formigas cortadeiras, terminando-o em 04 de novembro de 2011.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 – Atividade formicida de folhas de IB 151239 sobre <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae)	
Resumo.....	13
1. Introdução.....	14
2. Material e Métodos .....	16
2.1 Oferecimento de folhas de IB 151239 a colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .....	16
2.2. Medição da taxa de encapsulação e contagem de hemócitos .....	16
2.3. Ensaio respirométrico.....	18
2.4 Análises estatísticas .....	18
3. Resultados .....	19
4. Discussão.....	26
CAPÍTULO 2 – Efeito do extrato de IB 151239 no fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	
Resumo.....	35
1. Introdução.....	36
2. Material e Métodos .....	38
2.1. Isolamento e manutenção da cultura do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	38
2.2. Preparação dos extratos de IB 151239 .....	38
2.3. Ensaio de toxicidade .....	38
2.4. Extração etanólica e hexânica de IB 151239.....	39
2.5. Extração particionada com hexano, acetato de etila, clorofórmio e butanol .....	39
2.6. Testes biológicos com as frações obtidas com hexano, acetato de etila, clorofórmio e butanol .....	40
2.7. Fracionamento cromatográfico das frações ativas .....	40
2.8. Avaliação da atividade fungicida das frações .....	41
2.9. Identificação parcial das sub-frações do extrato etanólico de folhas de IB 151239 através do cromatógrafo em fase gasosa.....	41
2.10. Análises estatísticas .....	43

3. Resultados.....	44
4. Discussão.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	66

## RESUMO

RIBEIRO, Myriam Marques Ramos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Atividade formicida de IB 151239 em *Atta sexdens rubropilosa***. Orientadora: Terezinha Maria C. Della Lucia. Coorientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e Marcelo Coutinho Picanço.

Dentre as pragas de importância no Brasil, as formigas cortadeiras se destacam por causarem danos consideráveis nos eucaliptais e em diversos cultivos. Atualmente, o seu controle em larga escala utiliza ingredientes tóxicos como o fipronil, a sulfluramida e o clorpirifós, que eventualmente deverão ser proibidos frente à pressão exercida pelas certificadoras estrangeiras dos produtos florestais brasileiros. Assim, os objetivos deste estudo foram: avaliar o efeito de folhas de IB 151239 em colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, bem como seu efeito subletal nas operárias; avaliar o efeito fungicida dos extratos etanólico e hexânico de folhas de IB 151239 sobre o fungo simbionte das cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus*, e identificar as substâncias causadoras desse efeito presentes no extrato. Para avaliar a ação de folhas de IB 151239 nas colônias, os estudos foram realizados em formigueiros de laboratório, no Insetário do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa em salas sob a temperatura de  $25 \pm 5$  °C,  $75 \pm 5$  % U.R. e 12:12 (L:E). Folhas desse vegetal eram oferecidas diariamente às colônias. Os efeitos subletais eram avaliados, retirando-se operárias para medição da taxa de encapsulação, contagem do número de hemócitos totais presentes na hemolinfa e medição da taxa respiratória. Além disso, eram verificados o consumo foliar e o volume do jardim de fungo dessas colônias. Para avaliar a atividade fungicida de IB 151239, extratos hexânico e etanólico foram acrescidos ao meio de cultura do *L. gongylophorus*. Após a detecção do extrato mais ativo foi feito o fracionamento do mesmo e posterior identificação das possíveis substâncias causadoras do efeito fungicida. De acordo com os resultados encontrados, folhas de IB 151239 inibem o sistema imune de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, uma vez que, em colônias tratadas com esse vegetal, as operárias apresentaram menor taxa de encapsulação e diminuição na quantidade total de hemócitos. Além disso, após oferecimento desse vegetal às colônias, houve diminuição do consumo foliar e do volume do jardim de fungo. Os extratos etanólico e hexânico de IB 151239 provocaram efeito fungicida no simbionte mutualista das cortadeiras, sendo que a fração clorofórmica do extrato etanólico demonstrou a maior atividade. O sub-fracionamento

indicou possíveis substâncias fungicidas; dentre elas, o liral/intermedeol e avocadinofurano/(E)-nerolidil isobutirato/difenil-disulfide que necessitam ser confirmadas e testadas biologicamente.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Myriam Marques Ramos, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, November of 2011. **Lethal effect of IB 151239 on the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*.** Adviser: Terezinha M. C. Della Lucia. Co-Advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes and Marcelo Coutinho Picanço.

Important pests in Brazil, leaf-cutting ants cause considerable damage to several crops and to eucalyptus. Currently, they are controlled on a large-scale by using toxic ingredients such as fipronil, sulfluramide and chlorpyrifos; these eventually will be prohibited due to the pressures exerted by foreign certification of forest products in Brazil. The objectives of this study were to see if there is a detrimental effect of IB 151239 leaves on colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* and if so, the possible sublethal effect on workers; to evaluate the fungicidal effect of ethanolic and hexanic extracts of leaves of IB 151239 on the fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutters and to identify the substances in the extract which may be responsible for these toxic effects. To verify the effect of these leaves of IB 151239 on the colonies, studies were performed in laboratory colonies kept at the Insectary/ Department of Animal Biology Federal University of Viçosa, in rooms at  $25 \pm 5^\circ \text{C}$ ,  $75 \pm 5\% \text{RH}$  and 12:12 (L: E). Leaves of this plant were offered daily to the colonies. A sublethal effect was evaluated by measuring the encapsulation rate of workers taken from the colonies, counting the total number of hemocytes present in hemolymph and by measuring workers respiratory rate. In addition, leaf consumption was weighed daily and the fungus garden volume of these colonies was estimated every week. To evaluate the fungicidal activity of IB 151239, hexanic and ethanolic extracts were added to the culture medium of *L. gongylophorus*. After detection of the most active extract it was fractionated and used to a subsequent identification of possible substances causing the fungicidal effect was identified. Leaves of IB 151239 inhibit the immune system of workers of *A. sexdens rubropilosa*, as reflected by the lower encapsulation rate and the decrease in the total number of haemocytes in workers from colonies receiving the leaves. Furthermore, after offering this plant to the colonies, there was a gradual decline in leaf consumption and in the volume of the fungus garden. The ethanolic and hexanic extracts of IB 151239 caused a fungicidal effect on the mutualist symbiont; the chloroformic fraction of the ethanolic extract showed the highest activity.

The sub-fractionation indicated possible antifungals; among them, the liral / intermedeol and avocadinofurano / (E)-isobutyrate nerolidil / diphenyl disulfide were isolated but they need to be confirmed and tested biologically.

## INTRODUÇÃO GERAL

As formigas cortadeiras pertencentes aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), são responsáveis por danos econômicos em áreas agrícolas, pastagens e no setor florestal brasileiro (Della Lucia 1993; Anjos et al. 1998; Zanetti et al. 2003, Della Lucia 2011). Neste último, causam danos consideráveis e acarretam a maior parte dos custos de produção de florestas. Em 1997, Boareto e Forti relataram gasto nacional de 12.000 toneladas/ano de iscas para o controle das cortadeiras. De acordo com o IPEF, naquele ano, a área plantada de eucalipto era de 100 mil hectares e como em 2006 o setor de papel e celulose plantou 322 mil hectares de florestas no país (IPEF 2006) com um faturamento de US\$ 8,9 bilhões em 2005 (SBS 2007), verifica-se que esses gastos tendem a aumentar a cada ano. Na região Sudeste, o estado de Minas Gerais é o que possui maior área plantada (128 mil hectares); é também o estado com maior produção de carvão vegetal (mais de 5 mil toneladas/ano), destacando-se também no setor de papel e celulose, movelaria, entre outros (SBS 2007).

Vários são os métodos de controle utilizados para formigas cortadeiras como: barreiras físicas, métodos culturais, biológicos e químicos (Della Lucia & Araújo 2000; Oliveira et al. 2011). Apesar das opções disponíveis, o controle químico é o mais utilizado, sendo o único com tecnologia disponível para uso em escala comercial (Della Lucia & Araújo 2000; Oliveira et al. 2011). Os métodos de controle químico atualmente disponíveis são os gases liquefeitos, pós-secos, líquidos termonebulizáveis e iscas granuladas (Della Lucia & Vilela 1993; Boareto & Forti 1997), sendo estas últimas a base de fipronil, sulfluramida ou clorpirifós (Della Lucia & Araújo 2000).

Os danos causados ao ambiente pelos organossintéticos são já bem conhecidos; isso tem pressionado a agricultura nacional a utilizar técnicas de manejo de pragas cada vez menos agressivas ao homem e ao meio. Dentre esses danos, pode-se destacar a ressurgência e aparecimento de novas pragas, surtos de pragas secundárias, morte de insetos benéficos, resíduos em alimentos, resistência a inseticidas e contaminação do ambiente (Kogan 1998). Por esse motivo, as pesquisas focadas no controle de pragas têm buscado plantas inseticidas, que possuem efeito residual mais brando, e que podem ser utilizadas com eficiência no manejo, como uma alternativa aos produtos sintéticos atuais e que são danosos ao ambiente (Costa et al. 2004).

O uso de plantas que possuem propriedades inseticidas no controle de pragas é uma prática antiga (Guerra 1985; Roel et al. 2000). No entanto, foi substituída pelos

produtos sintéticos, descobertos na primeira metade do século passado, com as grandes guerras, devido a facilidade de utilização nas áreas de cultivo cada vez maiores. As plantas inseticidas têm se tornado ferramentas promissoras porque, muitas vezes suas substâncias tóxicas são biodegradáveis e mais seletivas (Raguraman & Singh 1999).

Segundo Isman (2006), alguns fatores parecem dificultar o sucesso das substâncias extraídas de plantas com efeito inseticida: barreiras regulatórias e a disponibilidade de novos produtos sintéticos que apresentam custo menor quando comparados aos produtos de origem botânica.

Grupos de pesquisa têm investigado o efeito tóxico de extratos de plantas no controle de pragas, como por exemplo, em pragas de grãos armazenados (Moreira et al. 2007), pragas de cultivo protegido (Cloyd 2004), pragas de tomate (Gokce et al. 2006), lepidópteros-praga de hortaliças (Moreira et al. 2004), entre outros.

Embora as cortadeiras sejam herbívoros que causam prejuízos expressivos, em culturas de importância econômica, apresentam características comportamentais e, ou, fisiológicas, que lhes confere a capacidade de selecionar o material a ser cortado (Hubbell & Wiemer 1983; Santana & Couto 1990; Della Lucia et al. 1995; Vendramin et al. 1995; Ribeiro & Marinho 2011) e isso pode ser utilizado no desenvolvimento de novas técnicas de controle. Quando uma espécie vegetal é evitada, provavelmente ela possui alguma característica física, mecânica ou química que é prejudicial às colônias. Segundo Hubbell e Wiemer (1983) a capacidade de seleção se deve a: 1) presença de compostos secundários que são tóxicos às formigas, ao fungo ou a ambos; 2) compostos secundários presentes nas plantas e que possivelmente, reduzem a digestibilidade do material vegetal, como os taninos; 3) o valor e as necessidades nutricionais do fungo e das formigas, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e substâncias-traço essenciais, como esteróides; 4) defesas mecânicas de plantas, incluindo sua dureza, densidade de tricomas e presença de látex; e 5) teor de umidade das folhas. Dentre estes, os compostos secundários constituem o fator que mais tem sido estudado no controle de formigas atualmente. Os mesmos autores relatam que *Atta cephalotes* é capaz de fazer distinções sobre a qualidade das folhas, não apenas entre espécies, mas também entre plantas individuais dentro de uma mesma espécie e até entre folhas diferentes da mesma planta. Isso se deve à presença de metabólitos secundários tóxicos, ou mesmo de compostos com potencial de redução de digestibilidade, como é o caso dos taninos (Bueno et al. 2004).

Os efeitos causados por esses vegetais nas operárias das cortadeiras podem variar de letais a subletais, sendo os primeiros os mais estudados nesses insetos.

Vários trabalhos têm sido feitos avaliando os efeitos letais causados por plantas com potencial inseticida no controle de saúvas como, por exemplo, o gergelim (*Sesamum indicum*) (Vieira et al. 1997), a mamona (*Ricinus communis*) (Hebling et al. 1996), a batata doce (*Ipomoea batatas*) (Vieira et al. 1997), o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (Takahashi-del-Bianco 2002), *Eucalyptus maculata* (Marsaro Jr. et al. 2004; Marinho et al. 2005; Marinho et al. 2006), o cedro (*Cedrela fissilis*) (Bueno et al. 2005), o barbatimão (*Dimorphandra mollis*) (Cintra et al. 2005), a *Cipadessa fruticosa* (Leite et al. 2005), o nin (*Azadirachta indica*) (Santos-Oliveira et al. 2006), o mentrasto (*Ageratum conyzoides*) (Ribeiro et al. 2008), o coentro (*Coriandrum sativum*), o hortelã (*Mentha piperita*) e a arruda (*Ruta graveolens*) (Ribeiro et al. 2008). Alguns desses trabalhos relatam os efeitos tóxicos desses vegetais nas operárias e no jardim de fungo das cortadeiras.

Quanto aos efeitos considerados subletais, pode-se listar alteração comportamental entre as companheiras de ninho, como observado em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando em contato com o sesquiterpeno  $\beta$ -eudesmol, extraído de folhas de *Eucalyptus maculata* (Marinho et al. 2005), que provocou agressão entre membros da mesma colônia.

Além de alterações comportamentais, outros efeitos subletais de inseticidas incluem a interação desses produtos com o sistema imune dos insetos. A ação desses inseticidas e suas respostas são variáveis, aumentando a capacidade de desencadear uma resposta imune, ou diminuindo-a (Desneux et al. 2007). Essa variação da resposta imune dos insetos ilustra a sua complexidade e a necessidade de estudos mais detalhados para compreendê-la.

As substâncias conhecidamente supressoras do sistema imune dos insetos são a actinomicina D, a ciclohexamida, a hidrocortisona e a azadiractina (Kaaya et al. 1987; Azambuja et al. 1991; Jarosz 1993; Jarosz 1994).

Experimentos com o imunossupressor Ciclosporina A mostraram que esta substância foi capaz de reduzir a resistência de larvas do lepidóptero *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) a uma bactéria patogênica (Fiolka 2008). Ciclosporinas são peptídeos cíclicos, hidrofóbicos, produzidos por várias espécies de fungos dos gêneros *Beauveria* (Bals.) Vuill., *Verticilium* Nees e *Tolyplocadium* W. Gams. Também, a ciclosporina A tornou-se uma das mais

importantes drogas médicas, usada para suprimir a rejeição de órgãos transplantados (Winkler 2000).

Até o momento, não se sabe os efeitos das plantas cortadas pelas formigas cortadeiras sobre o seu sistema imune, tampouco o de outros compostos químicos, incluindo os inseticidas.

A pesquisa tem avançado no sentido de isolar constituintes químicos que estariam presentes nos extratos vegetais de plantas que são ativos contra as formigas. Das plantas conhecidamente tóxicas às cortadeiras, já se identificou, em algumas delas, qual a substância (ou quais as substâncias) promovem a toxicidade para as formigas, seja por ingestão ou por contato. Em estudos com o gergelim, Morini et al. (2005) comprovaram que a sesamolina, ou a sesamina (encontrada no extrato da semente madura dessa planta), ou até mesmo a combinação dessas substâncias provoca intoxicação em operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Na mamona, Bigi et al. (2004) encontraram que a ricinina seria a principal substância causadora da mortalidade das operárias da saúva-limão, mediante ao extrato desta planta incorporado à dieta artificial líquida. Em estudos com o barbatimão verificou-se que o astilbin é a substância responsável pela rejeição da planta por *A. sexdens rubropilosa* (Cintra et al. 2005). Nesses trabalhos, os efeitos dos extratos de plantas tóxicas testados em formigas foram realizados oferecendo-se o extrato incorporado a uma dieta artificial (ingestão) ou por contato. Verifica-se, ainda, que na maioria dessas pesquisas o efeito tóxico é mais intenso quando os extratos são ingeridos do que quando aplicados no corpo das operárias (aplicação tópica).

Em trabalhos com o  $\beta$ -eudesmol, extraído de *Eucalyptus maculata* (Marsaro Jr. et al. 2004; Marinho et al. 2005; Marinho et al. 2006) e com o epóxido de cariofileno extraído de *Hymenaea courbaril* (Hubbell et al. 1983; North et al. 2000), constatou-se que estas duas substâncias promovem alteração comportamental em operárias, que é caracterizada por luta, mutilações de pernas, antenas e abdomens, levando ao desarranjo das colônias e possível destruição das mesmas. Marinho et al. (2005, 2006), oferecendo o  $\beta$ -eudesmol sintético nas arenas de forrageamento de saúva-limão também encontraram reação agressiva entre as companheiras de ninho, agressividade essa similar a aquela desencadeada frente ao produto natural.

Já Batista-Pereira et al. (2006) realizaram estudos com *A. sexdens rubropilosa* e extratos de sete espécies de eucalipto, e através de respostas eletrofisiológicas (eletroantenograma), encontraram que essa cortadeira responde bem ao estímulo de

*Eucalyptus cloeziana*, seguido de *E. camaldulensis*, *E. urophylla* e *E. saligna* com igual resposta, sendo estas três espécies mais preferidas para o corte que o *E. grandis* e *E. citriodora* (consideradas, então, resistentes) e que o *E. maculata* foi o menos preferido. Vale ressaltar que esses resultados reforçam ainda mais os resultados de testes de preferência realizados por Anjos e Santana (1994), Della Lucia et al. (1995) e Vendramin et al. (1995).

Até o momento, foram encontrados dois grupos de substâncias que causam efeito tóxico às cortadeiras: 1) Aquelas que promovem morte por intoxicação (sesamolina, sesamina, astilbin e ricinina); 2) aquelas que promovem alteração comportamental ( $\beta$ -eudesmol e o epóxido de cariofileno). Como se pode observar, os efeitos dos extratos de plantas, ou até mesmo de algumas substâncias presentes nessas plantas, podem se expressar de forma diferenciada. Outro aspecto que deve ser considerado também é que a maioria dos trabalhos são realizados com *A. sexdens rubropilosa* e no campo existem várias outras espécies de cortadeiras. Pode ser que um produto seja efetivo para uma espécie de formiga e não para outra. Marinho et al. (2006), utilizando o  $\beta$ -eudesmol em colônias das formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus molestans* e *A. subterraneus subterraneus* e ainda da formiga lava-pés *Solenopsis invicta*, observaram que não houve alteração comportamental nas operárias similar a que ocorreu em *A. sexdens rubropilosa*, *A. laevigata* e *A. bisphaerica*. Isso demonstrou que esse produto tem ação específica para o gênero *Atta*. Esses mesmos autores relataram ainda que o  $\beta$ -eudesmol desencadeou reação mais agressiva em colônias de *A. sexdens rubropilosa* em comparação com as demais espécies de *Atta* testadas. Ribeiro et al. (2008), em testes com aplicação tópica em operárias de *A. sexdens rubropilosa* e *Ac. subterraneus molestans* encontraram que o extrato de arruda (*Ruta graveolens*) foi altamente tóxico apenas na primeira espécie citada. Portanto, em estudos utilizando extratos de plantas com efeito tóxico deve-se estar atento ao fato de que se uma substância presente numa planta nem sempre é tóxica para todas as espécies de cortadeiras. Isso provavelmente inviabiliza a sua utilização no campo. O interessante a ser encontrado é uma substância extraída de uma planta, com baixo efeito residual, e que seja efetiva contra várias espécies de cortadeiras e não contra uma só espécie, o que implicaria na redução dos custos de controle dessas pragas.

Estudos prévios com algumas espécies de cortadeiras e com extratos de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) e hortelã (*Mentha piperita*) aplicados topicamente no

corpo de operárias de *A. sexdens rubropilosa* e *Ac. subterraneus molestans* proporcionaram até 100% de mortalidade (Ribeiro et al. 2008).

IB 151239 é uma planta da família Tropaeolaceae, originária do Peru, que pode agir como repelente a insetos herbívoros. Poucos trabalhos são encontrados mostrando a eficácia deste vegetal como pesticida, entretanto, muito se conhece sobre sua ação antibacteriana. Alguns autores mostraram uma eficiente ação carrapaticida do extrato etanólico de diversas partes aéreas de IB 151239. Ribeiro (2008) observou mortalidade de colônias de *Ac. subterraneus molestans* após oferecimento de folhas desse vegetal.

Diante do exposto e da escassez de trabalhos sobre os possíveis efeitos subletais de certas plantas às cortadeiras, é de suma importância investigar, com maior profundidade, o efeito de vegetais que podem afetar consideravelmente esses insetos e que podem auxiliar no manejo integrado dessas importantes pragas na região Neotropical. O estudo dos mecanismos de ação comportamental dessas substâncias poderá contribuir para maior entendimento do efeito dos produtos face à organização social das cortadeiras, permitindo maior suporte na sua aplicação prática. Esses estudos poderão evidenciar fontes de substâncias tóxicas às cortadeiras ou para o seu fungo simbionte, e assim constituir uma ferramenta alternativa e de menor impacto ambiental em relação aos métodos tradicionais do seu controle.

Esta tese está dividida em uma introdução geral e dois capítulos.

- No primeiro capítulo objetivou-se avaliar o efeito de folhas de IB 151239 em colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, bem como seu efeito subletal nas operárias.
- No segundo capítulo o objetivo foi avaliar o efeito fungicida dos extratos etanólico e hexânico de folhas de IB 151239 sobre o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbionte das formigas cortadeiras, bem como realizar o fracionamento do extrato com maior potencial fungicida e identificar as substâncias causadoras desse efeito.

## Referências Bibliográficas

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

ANJOS, N.; SANTANA, D. L. Q. Alterações deletérias no comportamento de *Atta laevigata* (F. Smith) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), causadas por folhas de *Eucalyptus* spp. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 23, n. 1, p. 25-30, 1994.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WARTHEN JR, J. D. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. Journal of Insect Physiology, v.37, n.1, p.771-777, 1991.

BATISTA-PEREIRA, L. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C.; CORRÊA, A. G. Eletrophysiological responses of *Atta sexdens rubropilosa* workers to essential oils of *Eucalyptus* and its chemical composition. Zeitschrift fur Naturforschung, v. 61c, n. 9-10, p. 749-755, 2006.

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; J FERNANDES, B. P.; VIEIRA, C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Pest Management Science, v. 60, n. 1, p. 933-938, 2004.

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

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

BUENO, F. C.; GODOY, M. P.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M.

F. G. F. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. *Sociobiology*, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.

CINTRA, P.; BUENO, F. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 45, n. 2, p. 347-353, 2005.

CLOYD, R. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? *Illinois: Pesticide Review*, v. 17, n. 3, p. 1234-1255, 2004.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIÚZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biológica Leopoldensia*, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

DELLA LUCIA, T. M. C. Formigas Cortadeiras. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. Métodos atuais de controle e perspectiva. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), Formigas Cortadeiras. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, p. 163-176, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; VILELA, E. F. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. *Revista Árvore*, v. 19, n. 1, p. 92-99, 1995.

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

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

DESNEUX, N., DECOURTYE, A.; DELPUECH, J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, v. 52, p. 82-106, 2007.

FIOLKA, M. J. Immunosuppressive effect of cyclosporin A on insect humoral immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, p. 287-292, 2008.

GOKCE, A.; WHALON, M. E.; CAM, H.; YANAR, Y.; DEMIRTAS, I.; GOREN, N. Plant extract contact toxicities to various developmental stages of Colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of Applied Biology*, v. 149, n. 2, p. 197-202, 2006.

GUERRA, M. S. Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus derivados. Brasília, EMBRATER, 166 p. 1985.

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

HUBBELL, S. P.; WIEMER, D. F. Host plant selection by an Attini ant. In: JAISSON, P. (Ed.). *Social Insects in the tropics*. Paris: University of Paris, v. 2, p. 133-154, 1983.

HUBBELL, S. P.; WIEMER, D. F.; ADEJARE, A. An antifungal terpenoid defends a Neotropical tree (Hymenaeae) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia*, v. 60, n. 1, p. 321-327, 1983.

IPEF [http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/BracelpaRelatorio\\_Estatistico\\_Florestal-2006.pdf](http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/BracelpaRelatorio_Estatistico_Florestal-2006.pdf).

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasing regulated world. *Annual Review of Entomology*, v. 51, p. 45-66, 2006.

JAROSZ, J. Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 106, p. 415-421, 1993.

JAROSZ, J. Hydrocortisone, a suppressive agent of inducible antibacterial immunity in *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera). *Cytobios*, v. 80, p. 243-248, 1994.

KAAYA, G.P., FLYG, C.; BOMAN, H.G. Induction of cecropin and attacin-like antibacterial factors in the haemolymph of *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry*, v. 17, p. 309-315, 1987.

KOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*, v. 43, p. 243–70, 1998.

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

MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N.; RIBEIRO, M. M. R.; LIMA, E. R.  $\beta$ -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  $\beta$ -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 47, n. 2, p. 445-454, 2006.

MARSARO JR., 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.

MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C.; BARBOSA, L. C. D.; GUEDES, R. N. C.; SILVA, L. M. Toxicity of leaf extracts of *Ageratum conyzoides* to Lepidoptera pests of horticultural crops. *Biological Agriculture & Horticulture*, v. 22, n. 3, p. 251-260, 2004.

MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C.; BARBOSA, L. C. D.; GUEDES, R. N. C., DE CAMPOS, M. R. SILVA, G. A.; MARTINS, J. C. Plant compounds insecticide activity against Coleoptera pests of stored products. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 7, p.909-915, 2007.

MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

NORTH, R. D.; HOWSE, P. E.; JACKSON, C. W. Agonistic behavior on the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. *Journal of Insect Behavior*, v. 13, n. 1, 1-13p, 2000.

OLIVEIRA, M.A.; ARAÚJO, M.S.; MARINHO, C.G.S.; RIBEIRO, M.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo integrado de formigas cortadeiras. In: *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, MG. pag. 400-421. 2011.

PIVOTO, F.L.; BUZATTI, A.; KRAWCZAK, F.S.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L.A.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; VOGEL, F.S.F. Ação acaricida *in vitro* de *Tropaeolum majus* sob teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural*, v. 40, n.10, p. 2141-2145, 2010.

RAGURAMAN, S.; SINGH, R. P. Biological effects of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on an egg parasitoid, *Trichogramma chilonis*. *Journal of Economical Entomology*, v. 92, p. 1274-1280, 1999.

RIBEIRO, M. M. R. Toxicidade de extratos botânicos a formigas cortadeiras. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.

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.; MARINHO, C.G.S. Seleção e forrageamento em formigas-cortadeiras. *Manejo integrado de formigas cortadeiras*. In: *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, MG. pag. 189-203. 2011.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 29, n. 4, p. 799-808, 2000.

SANTANA, D. A. Q.; COUTO, L. Resistência intra-específica de eucaliptos a formigas-cortadeiras. *Boletim de Pesquisa Florestal*, v. 20, n. 1, p. 13-21, 1990.

SANTOS-OLIVEIRA, M. F. S.; BUENO, O. C.; MARINI, T.; REISS, I. C.; BUENO, F. C. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 47, n. 2, p. 423-431, 2006.

SBS, 2007. Sociedade Brasileira de Silvicultura.

TAKAHASHI-DEL-BIANCO, M. TOXICIDADE DE EXTRATOS FOLIARES DE *Canavalia ensiformis* (L.) D. C. e de alguns princípios ativos de inseticidas comerciais para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Rio Claro, SP. UNESP, 173p. 2002.

VENDRAMIN, J. D.; SILVEIRA NETO, S.; CERIGNONI, J. A. Não-preferência de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) por espécies de *Eucalyptus*. *Ecosistema*, v. 20, n. 1, p. 87-92, 1995.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. A utilização de plantas inseticidas no controle de saúvas. In: Encontro de Mirmecologia, 13, 1997, Ilhéus. Anais... Ilhéus: UESC. p. 121-123. 1997.

WINKLER, M. Cyclosporin as baseline immunosuppression in solid organ transplantation. *Biodrugs*, v. 14, p. 185-193, 2000.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; VILELA, E.F.; LEITE, H.G.; JAFFÉ, K.; OLIVEIRA, A.C. Level of economic damage for leaf-cutting ants in *Eucalyptus* plantation in Brazil. *Sociobiology*, v. 42, n. 2, p. 433-442, 2003.

**Atividade formicida de folhas de IB 151239 sobre *Atta sexdens rubropilosa*  
(Hymenoptera: Formicidae)**

**Resumo**

As formigas cortadeiras são conhecidas pragas dos setores agrícola, florestal e de pastagens de toda a região Neotropical. O principal método de controle destas pragas são os inseticidas organosintéticos aplicados principalmente em forma de iscas granuladas. Devido à proibição ao uso dos princípios ativos atualmente usados no seu controle, imposta pelas certificadoras internacionais, diversas pesquisas em andamento buscam novas moléculas tóxicas a esses insetos. O uso de plantas com efeito tóxico às formigas e/ou a seu fungo simbiote é um ponto inicial nessas pesquisas. Várias substâncias já foram testadas no controle das formigas cortadeiras, contudo existem muitas possibilidades a serem exploradas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de folhas de IB 151239 às colônias de *A. sexdens rubropilosa* bem como efeitos subletais (defesa imune celular e taxa respiratória) das operárias tratadas com folhas dessa planta. Tanto a taxa de encapsulação como o número total de hemócitos foi menor em operárias de colônias tratadas com folhas de IB 151239, ou seja, folhas desse vegetal suprimem o sistema imune celular das operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Em relação ao consumo foliar das colônias tratadas, os resultados mostram que mesmo causando certas alterações no metabolismo das operárias, as mesmas não rejeitaram as folhas de IB 151239 ao longo do tempo. O volume do jardim de fungo das colônias tratadas foi significativamente menor que das colônias não tratadas, o que mostra que as folhas desse vegetal apresentaram algum efeito fungicida. Uma vez conhecido o efeito imunossupressor de folhas de IB 151239 em operárias de *A. sexdens rubropilosa*, e seu efeito no volume do jardim de fungo das colônias dessa subespécie, fazem-se necessárias a constatação dessa atividade fungicida e a identificação dos possíveis compostos que desencadeiam tal efeito.

## 1. Introdução

As formigas-cortadeiras, dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são pragas severas em cultivos florestais, agrícolas e pastagens em toda a região Neotropical (Della Lucia 2003). O seu controle é realizado utilizando principalmente iscas granuladas, podendo apresentar a sulfluramida ou fipronil como ingrediente ativo. Entretanto, o controle das cortadeiras é dificultado devido a características biológicas e comportamentais desses complexos insetos (Della Lucia & Araújo 2000). Devido a seu alto poder de bioacumulação (FSC 2007), tanto a sulfluramida como o fipronil tiveram seu uso proibido para as empresas que buscam o selo de certificação florestal do *Forest Stewardship Council* e poderão ser usados apenas até 2015. Com essa derroga imposta pela FSC (FSC 2010), diversas pesquisas têm sido feitas em busca de outras substâncias que sejam efetivas para o controle das formigas-cortadeiras. A substância ideal a ser descoberta precisa apresentar certas características como: ter ação lenta, ou seja, agir apenas quando dentro do formigueiro, não apresentando efeito sobre as operárias na trilha, podendo assim ser passada às demais operárias e à rainha via trofalaxia; possuir alguma substância atrativa, para que seja facilmente transportada ao formigueiro; apresentar ação fungicida e que essa não seja percebida pelas operárias no momento do transporte para o interior do formigueiro (por exemplo, se veiculada como isca) e ainda ser de fácil produção, ou seja, síntese rápida e fácil.

Uma das características que dificultam o controle das formigas-cortadeiras é a capacidade inata de selecionar o material vegetal a ser cortado e implantado no fungo simbiote. Essa seleção impede que muitos vegetais que apresentem substâncias danosas ao fungo e, ou, às operárias sejam carregados para o ninho (Rockwood 1976; Bueno et al. 2004; Morini et al. 2005). Dentre essas substâncias destacam-se saponinas, taninos, ligninas e outros compostos como terpenóides, alcalóides, e aminoácidos não-protéicos presentes em plantas, desempenhando papel importante contra herbívoros (Taiz & Zeiger 2003). Essas substâncias ou até misturas, que são utilizadas pelas plantas como defesa, podem atingir não apenas as operárias, mas também seu fungo simbiote, prejudicando a sua sobrevivência .

Os efeitos causados por compostos de plantas nas operárias das cortadeiras podem variar de letais a subletais. A alteração comportamental, como observado por Marinho et al. (2005) quando operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram expostas a  $\beta$ -eudesmol, é um exemplo de efeito subletal.

Efeitos subletais de inseticidas incluem ainda a interação desses produtos com o sistema imune dos insetos e as respostas são variáveis, ora aumentando a capacidade de desencadear uma resposta imune, ora diminuindo-a (Desneux et al. 2007). Essa variação da resposta imune dos insetos ilustra a sua complexidade e a necessidade de estudos mais aprofundados. Até o momento, não se sabe os efeitos das plantas tóxicas cortadas pelas formigas nem o efeito de compostos químicos, incluindo os inseticidas, sobre o seu sistema imune.

Dentre as substâncias químicas que afetam negativamente o sistema imune de insetos, conhecem-se, por exemplo, os efeitos imunossuppressores da actinomicina D, da ciclohexamida, da hidrocortisona e da azadiractina (Kaaya et al. 1987; Azambuja et al. 1991; Jarosz 1993; Jarosz 1994).

Muitas plantas com efeito inseticida têm sido testadas em formigas-cortadeiras, principalmente em se tratando do gênero *Atta* (Hebling et al. 1996; Vieira et al. 1997; Takahashi-Del-Bianco 2002; Santos-Oliveira et al. 2006; Marsaro Jr. et al. 2004; Marinho et al. 2005; Marinho et al. 2006; Marinho et al. 2008; Ribeiro et al. 2008), sendo algumas delas avaliadas nas operárias e no fungo simbiote, no entanto não são encontrados na literatura trabalhos que investigam a resposta imune.

Originária do Peru, a IB 151239 é uma planta de odor muito forte, que pode agir como um repelente para insetos herbívoros. Poucos destes atacam as folhas dessa planta, sendo mais comum a lagarta de *Ascia monuste orseis* Godart, 1819 (Lepidoptera: Pieridae), o curuquerê-da-couve (observação pessoal). Nas cortadeiras, Ribeiro (2008) relatou mortalidade de colônias de *Acromyrmex subterraneus molestans* após oferecimento de folhas desse vegetal.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade de folhas de IB 151239 às colônias de *A. sexdens rubropilosa* bem como os efeitos subletais – defesa imune celular e taxa respiratória - das operárias tratadas com folhas dessa planta.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Oferecimento de folhas de IB 151239 a colônias de *Atta sexdens rubropilosa*

Foram utilizadas 10 colônias de *A. sexdens rubropilosa* com a mesma atividade de forrageamento, sendo elas divididas aleatoriamente em dois grupos de cinco colônias. O primeiro grupo foi o controle e ao segundo foram oferecidas folhas de IB 151239. Nas colônias usadas, o volume do jardim de fungo variou de 1 a 2 L. Todas foram mantidas a  $25\pm 5$  °C,  $75\pm 5$  % U.R. e 12 horas de fotofase (Della Lucia et al. 1993). Folhas de IB 151239 oferecidas aos formigueiros foram coletadas no campus da Universidade Federal de Viçosa ( $20^{\circ}45' S$   $42^{\circ}52' W$ ) e em outras localidades próximas.

Vinte e quatro horas antes de se iniciar os testes foi retirado todo o substrato vegetal das colônias, as quais permaneceram em jejum. Após este, foram oferecidas 10 g de folhas de IB 151239 diariamente, a cada uma das colônias. Essas folhas foram pesadas em balança de precisão antes e 24 horas após seu oferecimento. Para o cálculo da correção da perda de água, folhas da mesma planta foram pesadas e mantidas intactas, fora do alcance das formigas, no mesmo local e ambiente onde as folhas foram oferecidas às colônias. Por diferença de peso se obtinha a perda de água das folhas (Antunes & Della Lucia 1999). Ao controle foram oferecidas diariamente 10 g de folhas de *Acalypha wilkesiana*, que também eram pesadas antes e após o oferecimento às colônias para a obtenção do consumo foliar diário. Observações diárias sobre o comportamento geral das colônias foram efetuadas, anotando-se o aspecto do fungo simbionte, além de seu volume determinado semanalmente de acordo com Hebling et al. (2000a).

### 2.2. Medição da taxa de encapsulação e contagem de hemócitos

Encapsulação seguida por melanização é uma forma eficiente de resposta do sistema imune inato contra infecção por parasitas (De Souza et al. 2009), muito usada para avaliar a imunocompetência de um inseto. Essa resposta celular envolve a adesão de hemócitos ao redor de um corpo estranho, melanização e formação de uma cápsula ao redor desse antígeno (Baer et al. 2005). Para iniciar esse processo, insere-se um antígeno inerte como, por exemplo, um microfilamento de nylon.

Operárias tratadas diariamente com folhas de IB 151239 e tratadas com acalifa (*Acalypha wilkesiana*) (controle) foram retiradas das colônias semanalmente, durante um mês (tempo máximo de sobrevivência das colônias), para a avaliação de seu sistema imune; medição da taxa de encapsulação e contagem de hemócitos. Cada colônia foi avaliada quatro vezes, sendo esta avaliação semanal.

Para a avaliação da taxa de encapsulação, 20 operárias sendo 10 das colônias controle e 10 das colônias do tratamento. Nessas formigas foi inserido um microfilamento de nylon transparente de 1,5 mm de comprimento e 0,12 mm de diâmetro entre o segundo e terceiro pares de pernas na região pleural. As operárias escolhidas para ambos os testes apresentavam aproximadamente 2,0 mm de cápsula cefálica. Após a introdução do antígeno, as operárias foram individualizadas em tubos de ensaio e mantidas em B.O.D. por 24 horas. Após esse intervalo de tempo os implantes foram removidos da hemocele, colocados em lâminas de vidro para montagem com resina Entellan. O filamento foi fotografado sob microscópio Axioskop 40 (Zeiss) com câmera PowerShot A6440 (Canon) e as imagens analisadas usando o programa ImageJ (National Institutes of Health). Foi assumido que a coloração mais escura (preto total) era a mais alta taxa de encapsulação (De Souza et al. 2009).

Para a contagem dos hemócitos também foram utilizadas 10 operárias das colônias controle e 10 das colônias tratadas. A hemolinfa foi coletada com o auxílio de um microcapilar graduado, após se decapitar a operária e manter o corpo da mesma sob pressão (Giannotti & Caetano 1985). Aproximadamente 0,25  $\mu\text{L}$  de hemolinfa foram retirados por formiga. À esta hemolinfa foram adicionados 0,50  $\mu\text{L}$  do corante Giemsa a 2% e 3,3  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão que impedia a coagulação dos hemócitos. Esta solução era transferida para câmara de Neubauer e posteriormente analisada sob microscópio (Olympus). A contagem dos hemócitos foi feita em relação ao número total dos mesmos, não se levando em consideração os diversos tipos de hemócitos.

### 2.3. Ensaio respirométrico

A produção de gás carbônico foi medida num analisador de CO<sub>2</sub> (TR3, Sable Systems International, Las Vegas, NV, USA) usando métodos adaptados de Hebling et al. (2000b) e de Guedes et al. (2006) para um respirômetro diferencial.

Para a realização dos testes retirou-se 14 operárias de cada grupo de colônias (tratamento e controle) sendo que elas apresentavam aproximadamente 2,0 mm de cápsula cefálica. Essas formigas foram colocadas duas a duas em uma série de frascos de 25 mL, num sistema fechado, onde a produção de CO<sub>2</sub> foi medida. Cada colônia foi avaliada quatro vezes, sendo esta avaliação semanal.

Os frascos foram conectados ao sistema por 3 horas antes da medição de CO<sub>2</sub> produzida pelas operárias. As medições foram obtidas pela injeção de ar livre de CO<sub>2</sub> nos frascos por 2 minutos a um fluxo de 600 mL/min. Essa corrente de ar direciona o CO<sub>2</sub> a um leitor infravermelho conectado ao sistema, permitindo a pronta quantificação de  $\mu\text{mol}$  de CO<sub>2</sub> produzido por hora. Após as medições, as formigas foram removidas dos frascos e tiveram suas cápsulas cefálicas medidas. Os valores de respiração foram normalizados pela cápsula cefálica das operárias.

### 2.4. Análises estatísticas

Os dados das medições das taxas de encapsulação, bem como do número de hemócitos e o valor médio de produção de CO<sub>2</sub> de cada colônia foram submetidos a uma análise de covariância com colônias tratadas e não tratadas como variável independente e tempo como covariável no programa estatístico SAS (SAS Institute, 2008).

### 3. Resultados

Os resultados encontrados na análise de covariância para a taxa de encapsulação, número de hemócitos, taxa respiratória, volume do jardim de fungo e consumo foliar (corte de folhas) das colônias tratadas e não tratadas com folhas de IB 151239 estão representados na Tabela 1.

Em relação à taxa de encapsulação e ao número de hemócitos na hemolinfa, observa-se que em ambos houve diferença entre operárias de colônias tratadas e não tratadas com o vegetal e a interação tratamento-tempo foi significativa (Tabela 1). Nas colônias tratadas, tanto a taxa de encapsulação quanto o número de hemócitos das operárias diminuiu ao longo do tempo, enquanto nas operárias das colônias controle houve aumento nesses números (Figura 1 e 2). Esses dois resultados mostram que o sistema imune celular das operárias de *A. sexdens rubropilosa* é suprimido pelas folhas desse vegetal.

Diferente dos demais parâmetros avaliados, a taxa respiratória variou apenas no tempo (Tabela 1), mostrando diminuição do metabolismo respiratório das operárias ao longo das semanas (Figura 3). Dessa forma constata-se que folhas de IB 151239 não interferiram no metabolismo respiratório das operárias.

O consumo foliar (corte de folhas) das colônias tratadas com folhas de IB 151239 foi menor que em colônias tratadas com folhas de *A. wilkesiana*, entretanto, o tempo não apresentou relação nessa diferença (Tabela 1, Figura 4), mostrando que mesmo causando certas alterações no metabolismo das operárias, as mesmas não diminuíram o corte e transporte de folhas desse vegetal, ou seja, não rejeitaram as folhas de IB 151239 ao longo do tempo.

O volume do jardim de fungo das colônias tratadas diferiu daquele das colônias não tratadas (Tabela 1), sendo que nas primeiras, em algumas colônias, o volume do fungo chegou a zero. Nas colônias tratadas com *A. wilkesiana* (controle) o volume do fungo permaneceu constante ou aumentou, diferindo das tratadas com IB 151239 em que o volume diminuiu drasticamente ao longo do tempo (Figura 5), o que mostra que as folhas desse vegetal apresentaram algum efeito fungicida.

Tabela 1. Valores da análise da covariância (GL, F e p) de parâmetros analisados (taxa de encapsulação, número de hemócitos, taxa respiratória, volume do jardim de fungo e corte do vegetal) em operárias de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com folhas de IB 151239.

Fonte de variação	Taxa de encapsulação			Número de hemócitos			Taxa respiratória			Volume do fungo			Corte do vegetal		
	GL	F	p	GL	F	p	GL	F	p	GL	F	p	GL	F	p
Tratamento	1	83.63	< 0.0001	1	511.43	< 0.0001	1	1.15	0.291	1	199.42	< 0.001	1	515.55	< 0.001
Tempo	3	0.42	0.737	3	1.48	0.237	3	20.92	< 0.0001	4	27.14	< 0.001	3	0.07	0.977
Trat x tempo	3	5.89	0.0026	3	8.25	0.0003	3	1.69	0.188	4	16.37	< 0.001	3	1.44	0.248

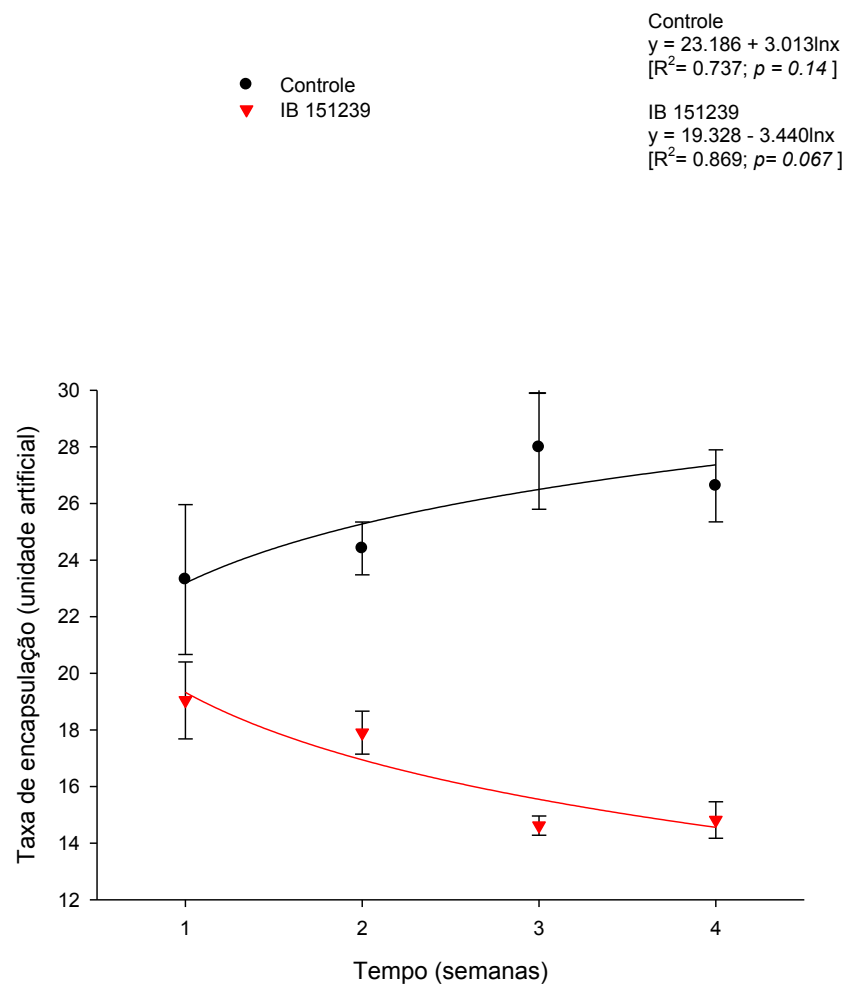


Figura 1. Taxa de encapsulação de operárias de *A. sexdens rubropilosa* de colônias tratadas ou não tratadas com folhas de IB 151239 em função do tempo.

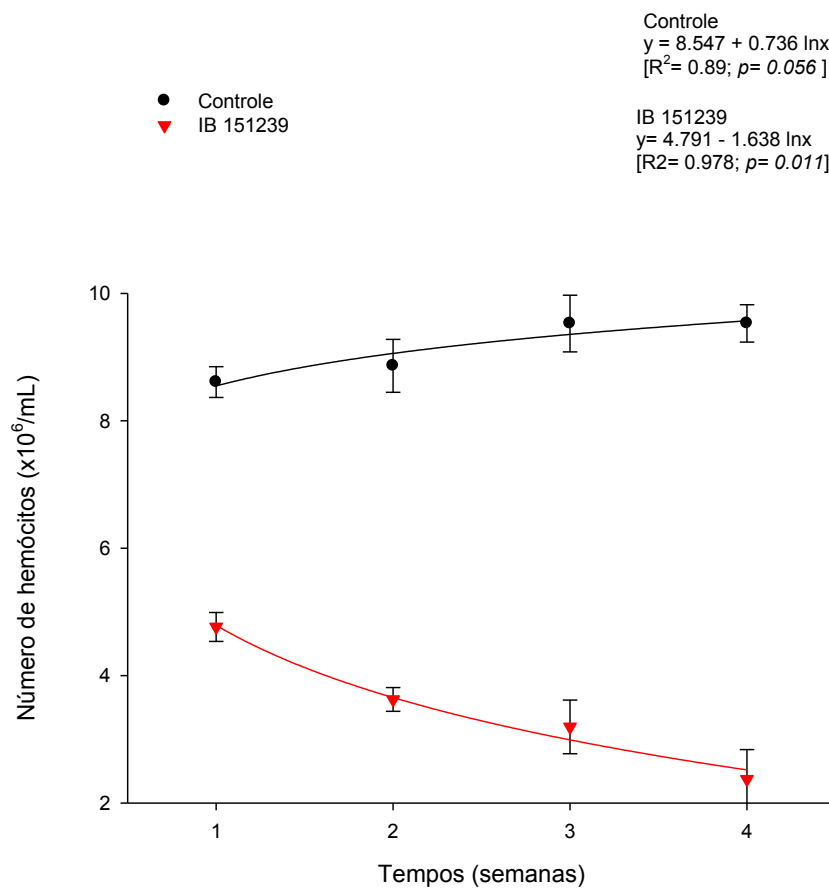


Figura 2. Número de hemócitos na hemolinfa de operárias de *A. sexdens rubropilosa* de colônias tratadas ou não tratadas com folhas de IB 151239.

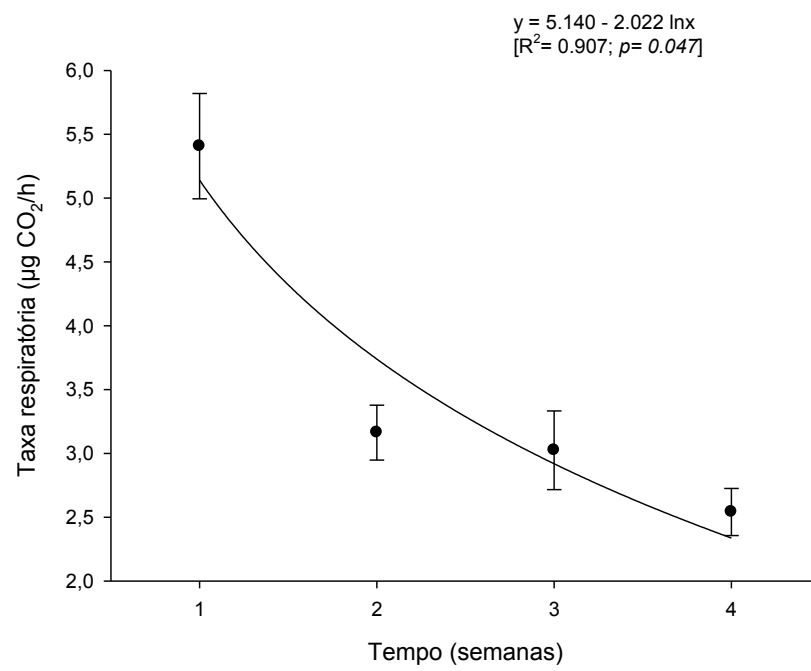


Figura 3. Taxa respiratória de operárias tratadas e não tratadas de *A. sexdens rubropilosa* ao longo do tempo.

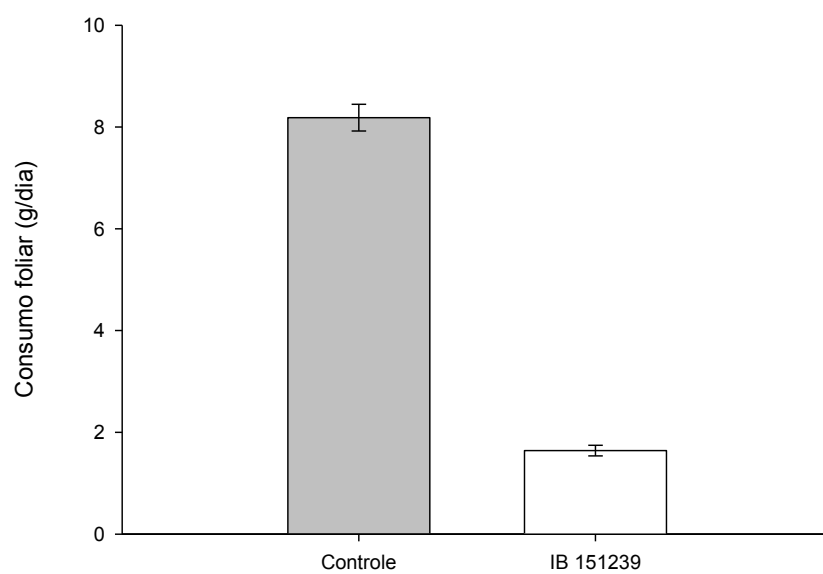


Figura 4. Consumo foliar (corte de folhas) de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com folhas de *Acalypha wilkesiana* (controle) e folhas de IB 151239. Houve diferença significativa segundo o teste F de Fisher a 5% de probabilidade.

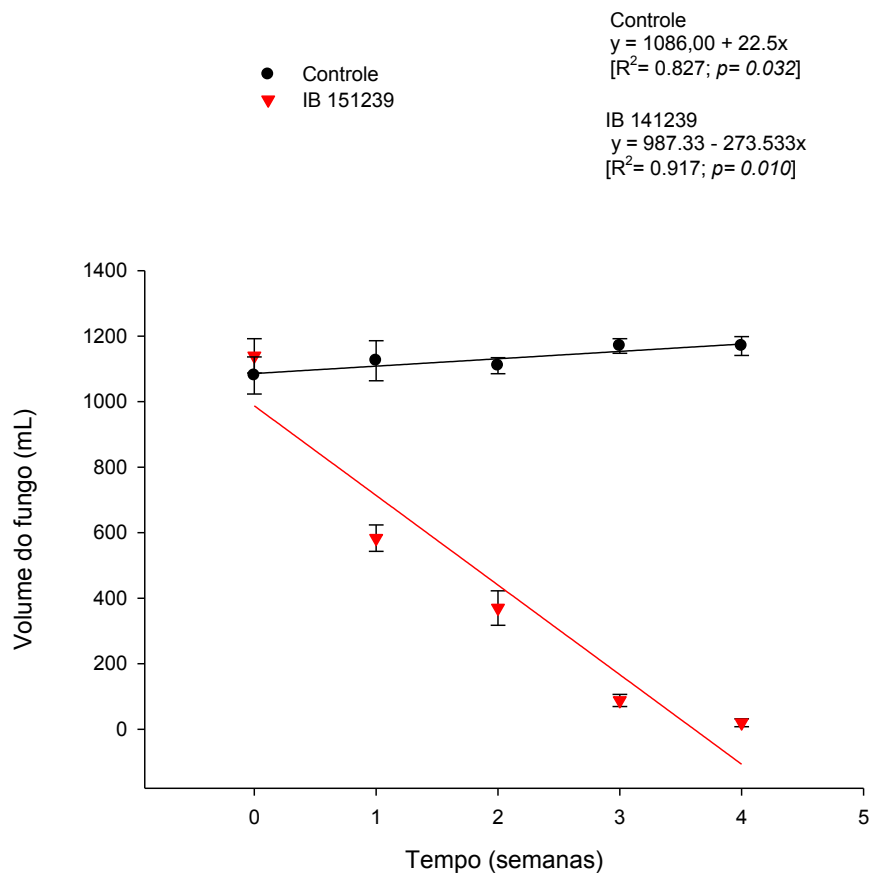


Figura 5. Volume do jardim de fungo de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas e não tratadas com folhas de IB 151239.

## Discussão

De acordo com os resultados encontrados, folhas de IB 151239 inibem o sistema imune de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, uma vez que, em colônias tratadas com esse vegetal, as operárias apresentaram menor taxa de encapsulação e diminuição na quantidade total de hemócitos. A inibição do sistema imune de insetos praga pode ser considerada uma característica positiva de um inseticida, sendo assumido que isso represente um efeito subletal do mesmo. Em se tratando de formigas cortadeiras, a supressão do sistema imune das operárias expõe as mesmas, e conseqüentemente a colônia, à situações de risco pois as deixam susceptíveis à possíveis patógenos e doenças, que em uma colônia saudável não seriam considerados um problema. Nesse momento de baixa imunidade da colônia, o possível controle da mesma é facilitado, podendo ser feito com doses mais baixas de inseticida ou até mesmo por algum fungo conhecidamente patogênico às operárias e,ou, ao fungo simbiote.

Diversos trabalhos mostram que substâncias extraídas de vegetais podem causar efeitos letais e,ou, subletais nas operárias, em seu fungo simbiote ou em ambos (Bueno et al. 2004; Marsaro Jr. et al. 2004; Marinho et al. 2005; Marinho et al. 2006; Marinho et al. 2008; Ribeiro et al. 2008; Gandra et al. 2011a). Até o momento, os efeitos subletais observados em operárias de cortadeiras foram alguns sintomas de intoxicação como tremores e lentidão, quando essas formigas entravam em contato com a ricinina, extraída do *Ricinus communis* (Bigi et al. 2004) e com o astilbin, extraído de *Dimorphandra molis* (Cintra et al. 2005). Também alteração comportamental como formação de grupos em agressão foi verificada quando operárias entraram em contato com o  $\beta$ -eudesmol, extraído de folhas de *Eucalyptus maculata* (Marinho et al. 2005; Marinho et al. 2006). Até o presente trabalho não se conhecia nenhum vegetal ou substância que interferisse no sistema imune das cortadeiras, provavelmente por ser uma área ainda pouco explorada.

Dentre as substâncias químicas que afetam negativamente o sistema imune de insetos, conhecem-se, por exemplo, os efeitos imunossupressores da actinomicina D, da ciclohexamida, da hidrocortisona, as ciclosporina A e da azadiractina (Kaaya et al. 1987; Azambuja et al. 1991; Jarosz 1993; Jarosz 1994; Fiolka 2008).

Assim como observado no presente trabalho com colônias de *A. sexdens rubropilosa* tratadas com folhas de IB 151239, a azadiractina também apresentou efeito imunossupressor, reduzindo o número total de hemócitos no inseto *Rhodnius prolixus*

(Azambuja et al. 1991). Outra maneira de se comprovar o efeito imunossupressor do vegetal oferecido às colônias da cortadeira foi a redução da taxa de encapsulação das operárias ao longo de tempo. Pelo que tudo indica, alguma substância ou substâncias das folhas de IB 151239 desencadeiam efeito semelhante ao da azadiractina no que diz respeito à resposta imune.

Apesar do efeito imunossupressor causado pelas folhas de IB 151239, esse vegetal não afetou o metabolismo respiratório das operárias, fato semelhante ao encontrado por Gandra et al. (2011b) para *A. bisphaerica* e *Acromyrmex balzani* quando em contato com extratos desse mesmo vegetal.

Além da alteração no sistema imune das operárias, folhas de IB 151239 provocaram outros efeitos negativos nas colônias de *A. sexdens rubropilosa* como a diminuição do volume do jardim de fungo, que pode ocasionar competição por alimento entre as larvas e os adultos; fato já observado por Araújo et al. (2004) em *A. bisphaerica* em regiões de queimadas; diminuição do corte de folhas e, por fim, morte das colônias.

Trabalhos efetuados com *A. sexdens rubropilosa* testando a toxicidade de folhas de *Ricinus communis* (Hebling et al. 1996), de *Canavalia ensiformes* (Hebling et al. 2000a) e *Ipomoea batatas* (Hebling et al. 2000b) também constataram redução do volume do jardim de fungo e aumento significativo da mortalidade de operárias em tempo variável a partir do tratamento com as folhas, porém, tempo este, sempre maior do que o obtido com o uso de IB 151239.

Neste trabalho, além da diminuição do jardim de fungo, verificou-se a mudança de coloração do fungo, o que indicou sua degeneração, pois seu aspecto inicial, úmido e cinza, passou a apresentar aparência amarela e ressequida até, em duas colônias de *A. sexdens rubropilosa*, a cor se tornar escura. Resultado semelhante foi encontrado por Hebling et al. (2000b) em colônias de *A. sexdens rubropilosa* tratadas com folhas de *Ipomoea batatas*. Provavelmente, vários fungos patogênicos se alojaram sobre o jardim; como por exemplo, o *Escovopsis*, parasita especialista do *L. gongylophorus*; já que a defesa da colônia era quase inexistente, ou seja, a colônia estava debilitada, devido a diminuição da defesa imune das operárias e à diminuição do fungo simbiote. Esse fato é claramente observado quando o formigueiro é submetido a uma situação de estresse, como observado por Rodrigues et al. (2005a) quando ninhos de cortadeiras foram submetidos a doses letais ou subletais de formicidas, ou quando as formigas foram removidas dos ninhos (Bass & Cherrett 1994; Rodrigues et al. 2005b).

Alguns autores consideram o formigueiro como um “organismo” e assim pode-se esperar que membros dessa microbiota possam se transformar em ameaças quando este “organismo” estiver debilitado.

Apesar do efeito observado no jardim de fungo e no sistema imune das operárias, essas formigas não deixaram de cortar e transportar as folhas de IB 151239 para dentro do jardim ao longo do experimento. Essa é uma característica importante para um formicida, se pensarmos nesse vegetal incorporado em iscas granuladas, uma vez que a rejeição é um dos grandes problemas durante a síntese de substâncias a serem incorporadas em iscas.

Poucos trabalhos foram feitos para constatar o efeito inseticida de IB 151239, sendo que em um deles, folhas deste vegetal foram oferecidas à larvas de *Pieris brassicae*, tendo ocorrido alto índice de mortalidade das mesmas nos últimos ínstares. Além disso, as folhas foram pouco cortadas por lagartas de ínstares iniciais. Os autores desse trabalho relataram que essa toxicidade está relacionada com a presença de substâncias tóxicas nas folhas e que a quantidade dessas substâncias é pequena, não causando mortalidade inicial. Em relação à cortadeiras, extrato foliar hexânico de IB 151239 incorporado à dieta foi altamente tóxico para operárias de *A. sexdens rubropilosa*, provocando 80% de mortalidade (Ribeiro 2008). Além disso, a autora relata que operárias dessa subespécie, após se alimentarem da dieta incorporada com o extrato na concentração de 100 mg/mL, apresentaram sintomas de intoxicação como: pouca movimentação, tremores nas pernas e prostração.

Ao que tudo indica, a substância ou substâncias encontradas nas folhas de IB 151239 têm efeito fungicida mais pronunciado do que o efeito formicida, já que os melhores resultados de controle ocorreram quando as folhas foram oferecidas às colônias, matando primeiramente o fungo simbionte e conseqüentemente as operárias, e a colônia. No entanto, as operárias podem ter sofrido efeitos diretos e indiretos da(s) substância (s) presentes no vegetal, pois além de terem seu sistema imune comprometido após se alimentarem da seiva das folhas, sofreram inanição com a morte do fungo simbionte. O efeito subletal causado nas operárias é um resultado importante do ponto de vista do manejo integrado das cortadeiras, uma vez que a supressão do sistema imune, predispõe a colônia a uma situação de maior fragilidade.

Frente aos resultados deste trabalho, faz-se necessário: a constatação da atividade fungicida e a identificação da substância ou substâncias causadoras desse efeito presente nas folhas de IB 151239; teste com outras espécies de formigas; testes

com rainhas, uma vez que todos os tipos de controle de cortadeiras visam à eliminação da rainha, e ainda a incorporação deste material em iscas granuladas para testar sua viabilidade no campo. Após todos estes testes, a planta IB 151239 pode vir a ser uma ferramenta promissora no manejo integrado de formigas cortadeiras.

## Referências bibliográficas

ANTUNES, E.; DELLA LUCIA, T. M. C. Consumo foliar em *Eucalyptus urophylla* por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Ciência Agrotecnologia, v. 23, n. 1, p. 208-211, 1999.

ARAÚJO, M. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PIKANÇO, M. C. Impacto da queima da palhada da cana-de-açúcar no ritmo diário de forrageamento de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera, Formicidae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 21, n.1, p. 33-38, 2004.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S., RATCLIFFE, N. A.; WARTHEN JR, J. D. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. Journal of Insect Physiology, v.37, p.771-777, 1991.

BAER, B.; KRUG, A.; BOOMSMA, J.J.; HUGHES, W.O.H. Examination of the immune response of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. Insectes Sociaux, v. 52, p. 298-303, 2005.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. Ecological Entomology, v. 19, n. 3, p. 215-220, 1994.

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B. P.; VIEIRA, C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Pest Management Science, v. 60, n. 1, p. 933-938, 2004.

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

CINTRA, P.; BUENO, F. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology, v. 45, n. 2, p. 347-353, 2005.

DE SOUZA, D. J., BEZIER, A., DEPOIX, D., DREZEN, J. M.; LENOIR, A. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. BMC Microbiology, v. 9, n. 29, 2009.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; ANJOS, N.; MOREIRA, D. D. O. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), Formigas Cortadeiras. Viçosa, MG: Folha de Viçosa. pp. 151-162, 1993.

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

DELLA LUCIA, T. M. C. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). Introducción a las hormigas de la región Neotropical. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 337-349, 2003.

DESNEUX, N., DECOURTYE, A.; DELPUECH, J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annual Review of Entomology, v. 52, p.82-106, 2007.

FIOLKA, M. J. Immunosuppressive effect of cyclosporin A on insect humoral immune response. Journal of Invertebrate Pathology, v. 98, p. 287-292, 2008.

FSC. FOREST STEWARDSHIP COUNCIL. FSC-GUI-30-001. Pesticide Policy: Guidance on Implementation, 2007.

FSC. FOREST STEWARDSHIP COUNCIL. FSC-GUI-30-001a V1-0 EN. Approved derogations for use of ‘highly hazardous’ pesticides, 2010.

GANDRA, L.C.; RIBEIRO, M.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C.; GUEDES, R.N.C. Mortality and respiratory rate of *Atta bisphaerica* ant workers (Hymenoptera: Formicidae) after application of a plant (*Ageratum conyzoides*) extract. Sociobiology, v. 57, n. 3, 2011a.

GANDRA, L. C.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Avaliação da taxa respiratória de operárias de cortadeiras de gramíneas sob efeito de

extratos botânicos. Simpósio de Integração Acadêmica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2011b.

GIANNOTTI, E.; CAETANO, F.H. A comparative study of the hemocytes of *Atta laevigata* adults (Formicidae: Myrmicinae). *Revista Brasileira de Genética*, v. 8, n. 1, p. 37-45, 1985.

GUEDES, R. N.C.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, N. M. P.; RIBEIRO, B.; SERRÃO, J. E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology*, v. 31, p. 30-38, 2006.

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

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

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 Applied Entomology*, v. 124, n. 5, p. 249-252, 2000b.

JAROSZ, J. Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 106, p. 415-421, 1993.

JAROSZ, J. Hydrocortisone, a suppressive agent of inducible antibacterial immunity in *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera). *Cytobios*, v. 80, p. 243-248, 1994.

KAAYA, G.P.; FLYG, C.; BOMAN, H.G. Induction of cecropin and attacin-like antibacterial factors in the haemolymph of *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry*, v. 17, p. 309–315, 1987.

- MARSARO JR., 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.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N.; RIBEIRO, M. M. R.; LIMA, E. R.  $\beta$ -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  $\beta$ -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 47, n. 2, p. 445-454, 2006.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; RIBEIRO, M. M. R.; MAGALHÃES, S. T. V.; GUEDES, R. N.; JHAM, G. N. Interference of  $\beta$ -eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin Entomological Research*, v. 98, p. 467-473, 2008.
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.
- RIBEIRO, M. M. R. Toxicidade de extratos botânicos a formigas cortadeiras. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.
- 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.
- ROCKWOOD, L. L. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecology*, v. 57, n. 1, p. 48-61, 1976.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiologica*, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005a.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI JR., M. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005b.

SANTOS-OLIVEIRA, M. F. S.; BUENO, O. C.; MARINI, T.; REISS, I. C.; BUENO, F. C. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 47, n. 2, p. 423-431, 2006.

SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Bookman. 719 p. 2003.

TAKAHASHI-DEL-BIANCO, M. Toxicidade de extratos foliares de *Canavalia ensiformis* (L.) D. C. e de alguns princípios ativos de inseticidas comerciais para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Rio Claro, SP. UNESP, 173p. 2002.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. A utilização de plantas inseticidas no controle de saúvas. In: Encontro de Mirmecologia, 13, 1997, Ilhéus. Anais... Ilhéus: UESC. p. 121-123. 1997.

## **Efeito do extrato de IB 151239 no fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus***

### **Resumo**

As formigas-cortadeiras são conhecidas por manterem uma estreita relação simbiótica com um fungo que é a principal fonte de alimentação das larvas e constitui parte da alimentação dos adultos. Essa simbiose é considerada um dos entraves no controle dessas importantes pragas, pelo fato do fungo simbiote, além produzir enzimas responsáveis pela digestão da celulose, destoxificar substâncias presentes nos vegetais que podem ser deletérias às formigas. Atualmente no controle desses insetos, as substâncias usadas apresentam efeito em apenas um lado da simbiose: as formigas. Encontrar uma molécula com efeito em ambos os lados do mutualismo seria de grande valia para o eficiente combate dessas formigas. Neste trabalho, objetivou-se constatar a ação fungicida de extratos hexânico e etanólico de folhas de IB 151239, bem como identificar possíveis substâncias causadoras desse efeito. Para isso, os extratos foram adicionados ao meio de cultura do fungo simbiote *L. gongylophorus* e o peso seco do mesmo foi quantificado após 30 dias. Ambos os extratos inibiram o crescimento do fungo, ou seja, apresentaram efeito fungicida, sendo o extrato etanólico o que desencadeou atividade mais pronunciada. No fracionamento desse extrato, a fração clorofórmica foi a mais ativa. As possíveis substâncias causadoras do efeito fungicida são liral/intermedeol e avocadinofurano/(E)-nerolidil isobutirato/difenil-disulfide. Faz-se necessária a confirmação dessas substâncias e posteriormente as mesmas devem ser testadas biologicamente.

## 1. Introdução

As formigas-cortadeiras, herbívoros dominantes nos neotrópicos, têm o hábito de cortar material vegetal e transportá-lo para dentro do ninho, onde servirá de substrato para cultivo de seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Hölldobler & Wilson 1990), associação que existe há pelo menos 50 milhões de anos (Rico Gray & Oliveira 2007, Schultz & Brady 2008).

Essa relação simbiótica mutualista existente na colônia entre as formigas e seu fungo, que serve como alimento para larvas e adultos, é considerada um entrave no controle desses insetos. Isso ocorre porque o fungo mutualista, além produzir enzimas responsáveis pela digestão da celulose, destoxifica substâncias presentes nos vegetais que podem ser deletérias às formigas. (Fowler et al., 1989).

As cortadeiras, por sua vez, apesar de cortarem uma gama de espécies vegetais, possuem uma capacidade inata de selecionar o material vegetal a ser cortado e implantado no fungo simbiote. Essa seleção impede que muitos vegetais que possam apresentar substâncias danosas ao fungo e, ou, às operárias sejam carregados para o ninho (Rockwood 1976; Bueno et al. 2004; Morini et al. 2005). Dentre essas substâncias destacam-se as saponinas, taninos e ligninas e outros como terpenóides, alcalóides, aminoácidos não-protéicos, que são aleloquímicos produzidos pelas plantas, desempenhando papel importante contra herbívoros (Taiz & Zeiger 2003). Em relação às cortadeiras, esses compostos de defesa dos vegetais podem atingir não apenas as operárias, mas também seu fungo simbiote.

A toxicidade de algumas substâncias oriundas de vegetais como a mamona (*Ricinus communis*) (Hebling et al. 1996), o gergelim (*Sesamum indicum*) (Vieira et al. 1997), a batata doce (*Ipomoea batatas*) (Vieira et al. 1997), o feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) (Takahashi-Del-Bianco 2002), o cedro (*Cedrela fissilis*) (Bueno et al. 2005) e *Helietta puberula* (Almeida et al. 2007) ao fungo *L. gongylophorus* já foram testadas. Mais recentemente, Ribeiro (2008) observou mortalidade de colônias de *Acromyrmex subterraneus molestans* após oferecimento de folhas de IB 151239. Nesse trabalho, a autora relatou que os ninhos submetidos ao tratamento com folhas desse vegetal apresentaram diminuição do jardim de fungo até a total morte do mesmo.

Originária da América do Sul, IB 151239 tem sido estudada nas últimas décadas devido a suas propriedades medicinais. Nessa planta, são encontrados alguns metabólitos secundários como o isotiocianato de benzila, com atividade antibacteriana,

antiviral e antifúngica; cubitacinas, com atividade medicinal e ácido erúico, considerado um eficiente antimicrobiano, inibindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Penicillium notatum* e *Candida albicans*.

Como a propriedade fungicida e formicida encontrada no IB 151239 constituem uma combinação desejável para os produtos desenvolvidos para o controle de formigas cortadeiras, faz-se necessário a sua investigação. O objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade de extratos etanólico e hexânico desse vegetal e das frações mais ativas desses extratos ao fungo simbionte *L. gongylophorus*, bem como identificar as possíveis substâncias presentes nesse vegetal, causadoras do efeito fungicida.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Isolamento e manutenção da cultura do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

O fungo *L. gongylophorus* foi isolado de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* coletados do campo, em áreas próximas ao local de estudo e mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa segundo Della Lucia et al. (1993).

O isolamento de *L. gongylophorus* se deu pela retirada de fragmentos do jardim e da sua transferência asséptica para placas de Petri contendo meio de cultura. Este era composto de peptona, cloreto de sódio, extrato de malte, glicose, aveia em flocos, ágar, água destilada e o antibiótico cloranfenicol. Após preparado, o meio era autoclavado a 120°C e 1,1 atm por 30 minutos (Pagnocca et al. 1990).

As culturas do fungo foram mantidas em incubadora B.O.D. (25±2°C) por um mês, devido a seu lento crescimento. Após esse tempo, “plugs” (fragmento do fungo cortado com tamanho definido) de 1 cm de diâmetro eram retirados das culturas e assepticamente transferidas a outras placas (um “plug” por placa) contendo meio novo para a manutenção da cultura.

### 2.2. Preparação dos extratos de IB 151239

As folhas de IB 151239 foram coletadas no *Campus* da Universidade Federal de Viçosa e em outras localidades próximas. O material foi seco em estufa a 40°C por um período de 48 horas e triturado em triturador industrial até que as folhas se tornassem pó. O pó formado foi colocado em erlemeyer de 2L e coberto com hexano. Após 72 horas, a solução hexânica foi retirada sob filtração e o material vegetal foi submetido à extração com etanol por 72 horas. Os extratos hexânicos e etanólicos foram concentrados em evaporador rotativo a baixa pressão e temperatura reduzida (< 50° C). Os extratos foram armazenados sob refrigeração para os testes biológicos (Bueno et al. 2004).

### 2.3. Ensaio de toxicidade

Os extratos hexânicos e etanólicos foram diluídos em diclorometano e adicionados ao meio de cultura autoclavado, contendo peptona, cloreto de sódio, extrato

de malte, glicose, aveia em flocos, ágar e água destilada; até as concentrações finais de: 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/mL. A quantidade de meio colocada em cada placa foi de 10 mL, seguida de um “plug” de fungo de 1 cm de diâmetro colocado em cada placa, totalizando 20 placas por concentração. O antibiótico rifampicina foi adicionado ao meio após colocá-lo na placa de Petri. As placas contendo o fungo nas diferentes concentrações dos extratos foram mantidas em incubadora B.O.D. ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por um mês para a avaliação do crescimento. Após esse tempo, os “plugs” de fungo foram retirados, colocados em copos de papel alumínio e em seguida levados a estufa a temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  por 3 dias, até a estabilização do peso seco.

#### 2.4. Extração etanólica e hexânica de folhas de IB 151239

As folhas de IB 151239 (526,9 g) foram distribuídas em doze balões de erlenmeyers de 250 mL onde se adicionava etanol PA para manter submerso esse material, durante dez dias sob agitação, no Laboratório de Biomoléculas do Departamento de Química da UFV. Ao final desse período, o extrato etanólico dessas folhas foi filtrado em papel-filtro de 12,5 cm de diâmetro e 205  $\mu\text{m}$  de porosidade e concentrado no evaporador rotativo a  $50^{\circ}\text{C}$ , produzindo um óleo verde escuro. Em seguida, foi adicionado hexano PA para a extração das substâncias apolares, seguindo o mesmo procedimento citado acima.

#### 2.5. Extração particionada com hexano, acetato de etila, clorofórmio e butanol

A partir do extrato etanólico obtido, retirou-se 43,7 g o qual foi diluído em 600 mL de uma solução de metanol e água (1:1), que logo em seguida, foi transferida para um balão de decantação. Ao extrato dissolvido foram adicionados 300 mL de hexano. Essa mistura foi agitada vigorosamente e decantada por 2 minutos, para que houvesse separação das fases polar (fase com metanol:água) e apolar (fase com hexano). As duas frações obtidas (polar e apolar) foram separadas em erlenmeyer de 1L e a fração polar foi novamente extraída com hexano por mais duas vezes, a fração hexânica foi recolhida, filtrada, concentrada no evaporador rotativo à temperatura inferior a  $50^{\circ}\text{C}$  e armazenada em refrigerador. Em seguida, o mesmo procedimento foi adotado, utilizando como solvente o clorofórmio, depois o acetato de etila e por fim, o butanol para a obtenção de extratos particionados desses solventes (Leitão et al. 2005).

A partir do extrato hexânico retirou-se 21,13 g e seguiu o mesmo procedimento de extração particionada utilizando os mesmos solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol), conforme anteriormente descrito.

## 2.6. Testes biológicos com as frações obtidas com hexano, acetato de etila, clorofórmio e butanol

As cinco frações obtidas de cada extrato (etanólico e hexânico) foram levadas ao Insetário/DBA/UFV para os testes no fungo *L. gongylophorus*.

Cada uma das frações particionadas foram diluídas em diclorometano e adicionada ao meio de cultura autoclavado, contendo peptona, cloreto de sódio, extrato de malte, glicose, aveia em flocos, ágar e água destilada; até as concentrações finais de: 25 e 50 mg/mL. A quantidade de meio colocada em cada placa foi de 10 mL e em seguida dois “plugs” de fungo de 1 cm de diâmetro foram colocados em cada placa, totalizando 5 placas por concentração. O antibiótico rifampicina foi adicionado ao meio após colocá-lo na placa de Petri. As placas contendo o fungo nas diferentes concentrações dos extratos foram mantidas em incubadora B.O.D. ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por um mês para a avaliação do crescimento.

Após esse tempo, os “plugs” de fungo foram retirados, colocados em copos de papel alumínio e em seguida levados à estufa a temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  por 3 dias, até a estabilização do peso seco. Todos os “plugs” foram pesados para a comparação entre os tratamentos.

## 2.7. Fracionamento cromatográfico das frações ativas

O fracionamento de compostos ativos foi realizado no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas no Departamento de Entomologia da UFV, utilizando colunas cromatográficas contendo sílica gel 60 (70-230 Mesh-ASTM, Merck) como fase estacionária. Nas análises cromatográficas em camada delgada foram utilizadas placas preparadas com sílica gel 60.

Para cada separação cromatográfica foi feita a seleção do solvente ou da composição de solventes, em cromatografia de camada delgada (CCD), que proporcionasse a melhor separação dos constituintes. As frações foram recolhidas em frascos de 10 mL e deixadas em capela de exaustão para evaporação do solvente. Foi

feita a comparação das manchas em placas de CCD para o agrupamento das frações recolhidas. Os reveladores utilizados foram solução de fosfomolibidico/etanol (12g/150 mL) ou observação sob luz ultravioleta a 254 ou 360 nm.

O primeiro fracionamento utilizou uma coluna de 6,0 cm de diâmetro por 50 cm de altura contendo aproximadamente 45 cm de sílica e as seguintes proporções de solventes: hexano/acetato de etila (3:7), acetato de etila puro, acetato de etila/metanol (1:1), acetato de etila/metanol (7:3) e metanol puro. O segundo e terceiro fracionamento utilizaram uma coluna com 2,5 cm de diâmetro por 50 cm de altura contendo aproximadamente 40 cm de sílica e as seguintes proporções de solventes: acetato de etila/clorofórmio (2:8), acetato de etila/clorofórmio (4:6), acetato de etila/clorofórmio (6:4), acetato de etila/clorofórmio (8:2), acetato de etila puro, acetato de etila/metanol (8:2), acetato de etila/metanol (6:4), acetato de etila/metanol (2:8) e metanol puro.

## 2.8. Avaliação da atividade fungicida das frações

As frações obtidas em maior quantidade foram escolhidas para os testes biológicos. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 2.5.

## 2.9. Identificação parcial das sub-frações do extrato etanólico de folhas de IB 151239 através do cromatógrafo em fase gasosa (CG)

As sub-frações do extrato etanólico de folhas de IB 151239 foram injetadas no cromatógrafo a gás QP-2010 da *Shimadzu* com injetor manual. Fluxo constante de 1,0 mL de gás carreador (hélio) e pressão do injetor variável para manter esse fluxo. As condições de operação do aparelho CG estão especificadas no Tabela 1.

Com os tempos de retenção dos compostos identificados e dos padrões de hidrocarbonetos (C7 – C30), foram calculados os Índices de Kovats (I), conforme fórmula abaixo. A partir dessas informações identificou-se os compostos das amostras tendo como base os índices de Kovats tabelados por Adams (2007).

$$I = 100 \cdot Z + 100 \cdot ((\log t'_{R_x} - \log t'_{R_z}) / (\log t'_{R_{(z+1)}} - \log t'_{R_z}))$$

onde:

$I$  = número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) que o composto cujo índice está sendo determinado;

$z$  = número de carbonos de um alcano saturado normal;

$t'_{Rx}$  = tempo de retenção ajustado do composto  $x$ ;

$t'_{Rz}$  e  $t'_{R(z+1)}$  = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que  $t'_{Rx}$  é intermediário a  $t'_{Rz}$  e  $t'_{R(z+1)}$  (Bonato, 1997);

Tabela 1. Parâmetros de funcionamento do cromatógrafo de fase gasosa (CG) utilizados para a identificação parcial das sub-frações do extrato etanólico de folhas de IB 151239.

Parâmetros de funcionamento do CG	Condições
Temperatura inicial	35°C por 5 min.
Programa de temperatura	8°C/min até 310°C por 5 min
Temperatura do injetor	250°C
Temperatura do detector (F.I.D.)	310°C
Controlador do fluxo	"Splitless"
Tipo de coluna	DB-5
Diâmetro/comprimento da coluna	0,32 mm / 30 m
Espessura da fase estacionária	0,25 µm.

## 2.10. Análises estatísticas

Os dados de concentração letal dos extratos etanólico e hexânico de IB 151239 ao fungo simbiote foram submetidos a uma análise de probit (PROC PROBIT, SAS Institute, 2008); a razão de toxicidade foi calculada e os intervalos de confiança (95%) dessa toxicidade foram estimados segundo Robertson et al. (2007). Os demais resultados (comparação da toxicidade entre as diferentes frações) foram submetidos a análise de variância seguido pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ) quando necessário (SISVAR 5.3).

### 3. Resultados

#### 3.1. Toxicidade dos extratos etanólico e hexânico de IB 151239 ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Não ocorreu inibição do crescimento do fungo no controle e seus valores foram usados para corrigir a inibição das diferentes concentrações dos extratos.

O modelo de probit foi adequado aos dados baseado no teste de qui-quadrado de adequabilidade do modelo (Etanólico:  $\chi^2 = 4,36$ ;  $P=0,22$ ; Hexânico:  $\chi^2 = 3,96$ ;  $P=0,26$ ).

Com os resultados encontrados observa-se que ambos os extratos, etanólico e hexânico, de folhas de IB 151239, são tóxicos para o fungo simbiote das cortadeiras, inibindo o crescimento do mesmo e aumentando essa inibição com o aumento da concentração. Isso confirma, portanto, a ação fungicida dos mesmos (Figura 1). A inibição máxima observada (91,11%) foi na maior concentração usada (100 mg/mL) para o extrato etanólico. Já para o extrato hexânico, esse valor foi de 87,34%.

Em relação à razão de toxicidade, observa-se que o extrato etanólico foi 1,77 vezes mais potente que o hexânico, apresentando menor  $CL_{50}$  (Tabela 2). A inclinação da reta do extrato etanólico foi maior que a do extrato hexânico, mostrando que a resposta daquele extrato é mais rápida. Devido a esses resultados encontrados, o extrato etanólico tornou-se o foco de atenção deste trabalho.

#### 3.2. Toxicidade das frações particionadas de IB 151239 ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

A partir do extrato etanólico (43,67 g) produziu-se cinco frações por partição: fração hexânica (FHEE) (27,57 g), clorofórmica (FCEE) (2,70 g), fração de acetato de etila (FAEE) (1,36 g), butanólica (FBEE) (5,39 g) e aquosa (6,46 g), totalizando 43,49g. Do extrato hexânico (20,63 g) obteve-se também cinco frações: fração hexânica (FHEH) (7,31 g), clorofórmica (FCEH) (0,63 g), fração de acetato de etila (FAEH) (0,27 g), butanólica (FBEH) (0,81 g) e aquosa (0,48 g), totalizando 9,5 g.

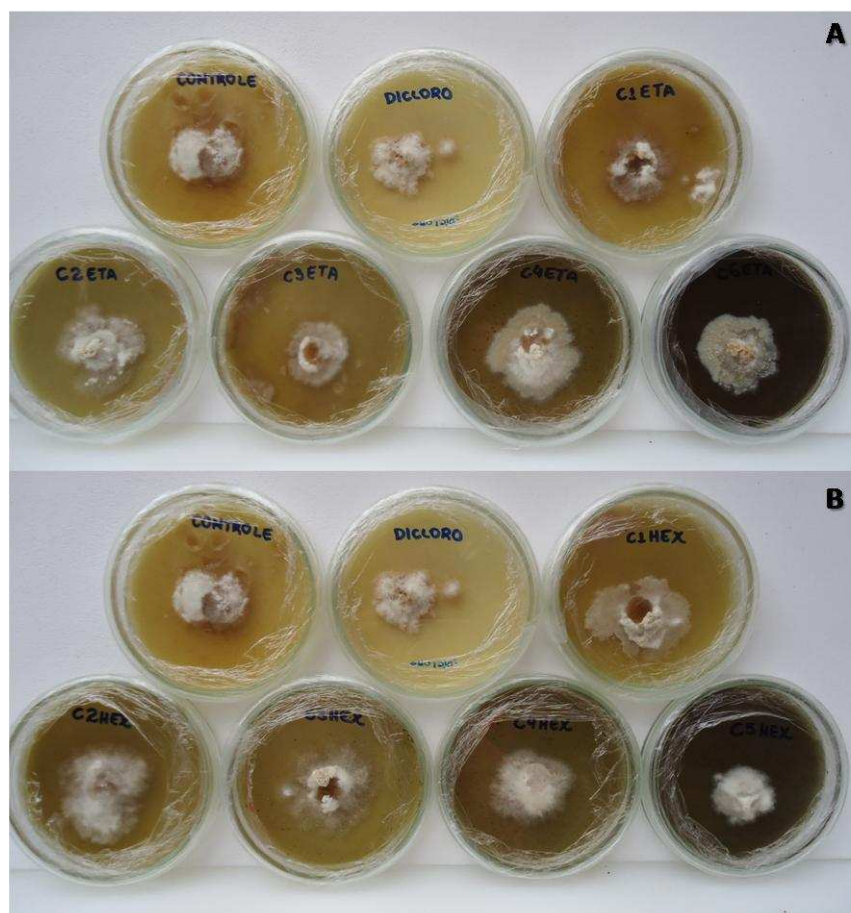


Figura 1. Crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extratos de IB 151239. A) Extrato etanólico; B) Extrato hexânico.

Tabela 2. Concentração letal dos extratos etanólico e hexânico de folhas de IB 151239 ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

Extrato	Inclinação ( $\pm$ EP)	CL <sub>50</sub> (mg/mL)	Razão de toxicidade (95% IC)	$\chi^2$	P
Etanólico	2,13 ( $\pm$ 0,17)	11,68 (8,65 – 14,73)	1,00 (0,70 – 1,44)	4,36	0,22
Hexânico	1,27 ( $\pm$ 0,15)	20,66 (17,94 – 23,69)	1,77 (0,72 – 2,37)	3,96	0,26

As frações acetato de etila e aquosa do extrato hexânico não foram usadas para os bioensaios devido a pequena quantidade conseguida das mesmas (0,27 e 0,48 g, respectivamente).

Dentre as frações particionadas (etanólica e hexânica), houve diferença quanto à inibição do fungo ( $F_{6,126} = 6,91$ ;  $P < 0,001$ ) (Tabela 3). Quando comparadas as duas concentrações usadas (25 e 50 mg/mL) não houve diferença significativa ( $F_{1,126} = 1,65$ ;  $P = 0.2003$ ). Entretanto, houve diferença na interação fração\*concentração ( $F_{6,126} = 5,58$ ;  $P < 0.001$ ). No desdobramento da interação tem-se que apenas dentro da concentração de 50 mg/mL houve diferença entre as frações na inibição do crescimento do fungo simbionte ( $F_{6,126} = 10,21$ ;  $P < 0,001$ ) (Tabela 4). Dentro de cada fração, houve diferença entre concentrações apenas nas frações clorofórmica do extrato etanólico (FCEE) ( $F_{1,126} = 4,08$ ;  $P = 0,045$ ) e hexânica do extrato etanólico ( $F_{1,126} = 22,71$ ;  $P < 0,001$ ) (FHEE), sendo que em ambas as frações, a maior média de inibição foi observada na concentração de 50 mg/mL.

As maiores médias de inibição, em valores absolutos, foram observadas para as frações clorofórmicas do extrato etanólico e hexânico, entretanto, devido à pequena quantidade obtida dessa última fração, seguiu-se o fracionamento apenas da fração etanólica.

### 3.3. Toxicidade das frações e sub-frações de IB 151239 ao fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*

Foram obtidas oito frações relativas ao fracionamento da fração clorofórmica do extrato etanólico. As quantidades de cada fração obtida estão representadas na Tabela 5. Com base na quantidade dessas frações, foram escolhidas quatro (frações 3, 4, 6 e 7) para os bioensaios com o fungo (Figura 2).

Dentre as quatro frações testadas, houve diferença significativa na inibição do crescimento do *L. gongylophorus* ( $F_{3,12} = 241,9$ ;  $P < 0,001$ ), sendo que as frações 3 e 4 inibiram completamente o crescimento desse fungo (Tabela 6).

Devido a inibição completa do crescimento de *L. gongylophorus*, as frações 3 e 4 foram refracionadas (3º fracionamento). Os fracionamentos dessas frações resultaram em 5 sub-frações cada uma, e o peso de cada uma delas está representado na Tabela 7. Com as sub-frações resultantes desse 3º fracionamento não foram realizados bioensaios devido a pequena quantidade do material obtido.

Tabela 3. Média da inibição (%) do crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura contendo diferentes frações dos extratos etanólico e hexânico de IB 151239.

Fração	Média da inibição*
FHEE	37,58 c
FBEE	48,72 bc
FBEH	55,13 abc
FAEE	57,05 abc
FHEH	71,15 ab
FCEH	76,92 a
FCEE	79,61 a

\*Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Média da inibição (%) do crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura contendo diferentes frações dos extratos etanólico e hexânico de IB 151239 na concentração de 50 mg/mL.

Fração	Média da inibição
FHEE	9,37 b
FBEE	57,69 a
FBEH	61,53 a
FAEE	66,67 a
FHEH	79,48 a
FCEH	80,00 a
FCEE	91,56 a

\*Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Peso (g) das frações obtidas do fracionamento da fração clorofórmica do extrato etanólico de IB 151239.

Frações	Peso (g)
1	0,082
2	0,009
3	0,151
4	0,175
5	0,056
6	0,239
7	0,557
8	0,111

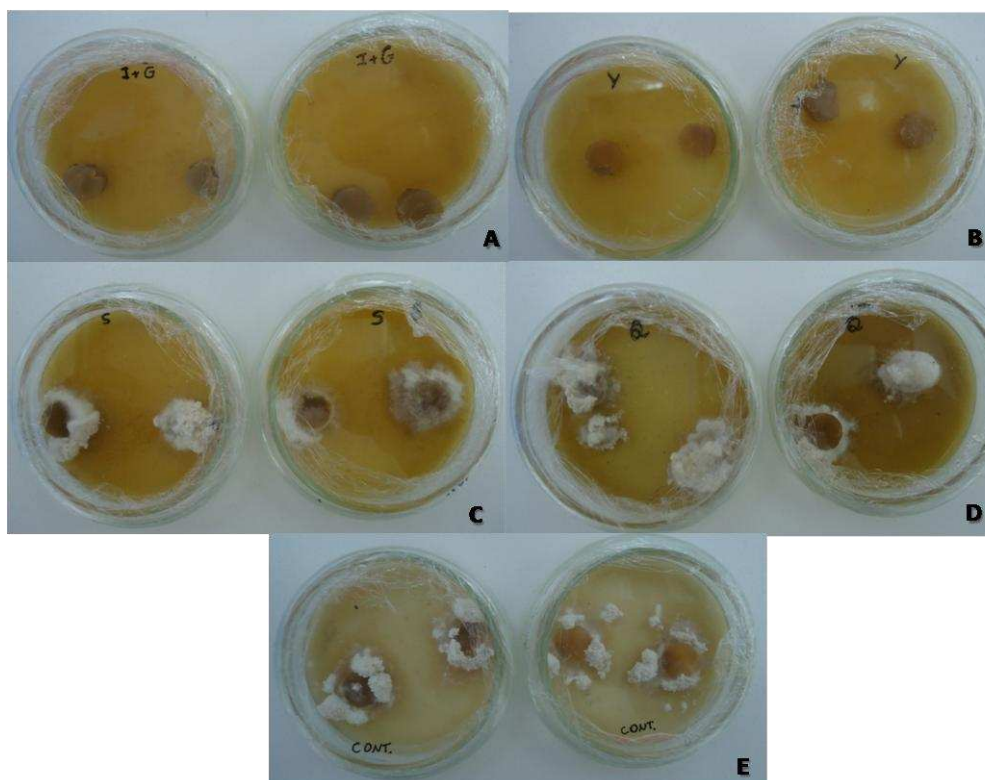


Figura 2. Crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes frações da fração clorofórica do extrato etanólico de IB 151239. A) Fração 3; B) Fração 4; C) Fração 6; D) Fração 7; E) Controle.

Tabela 6. Média da inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus*.

Fração	Inibição do crescimento (%)
3	100
4	100
6	28,12
7	18,75

Tabela 7. Peso (g) das sub-frações obtidas do refração das frações 3 e 4.

Sub-frações	Peso (g)
3-1	0,0216
3-2	0,0007
3-3	0,0031
3-4	0,0159
3-5	0,0162
4-1	0,0322
4-2	0,0069
4-3	0,0079
4-4	0,0042
4-5	0,0266

### 3.4. Identificação das possíveis substâncias presentes nas sub-frações de 3 e 4

As possíveis substâncias presentes nas sub-frações das frações 3 e 4 estão representadas na tabela 8 e foram encontradas com base no cálculo do índice de Kovats (Adams 2007).

As substâncias presentes em maior frequência foram liral/intermedeol (Figura 3), presente nas sub-frações 3-1,3-3,4-1,4-3,4-4 e 4-5 e avocadinofurano/(E)-nerolidil isobutirato/difenil-disulfide (Figura 4) nas sub-frações 3-1,4-1, 4-2, 4-3, 4-4 e 4-5.

Os possíveis compostos presentes em cada uma das sub-frações estão representados nas tabelas 9 a 18, com seus respectivos índices de Kovats, porcentagem presente em cada amostra (porcentagem da área) e tempo de retenção.

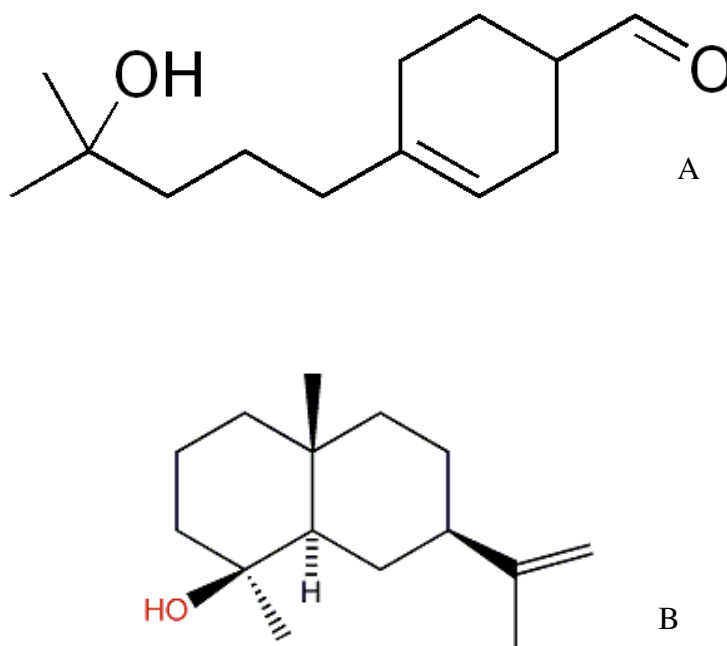
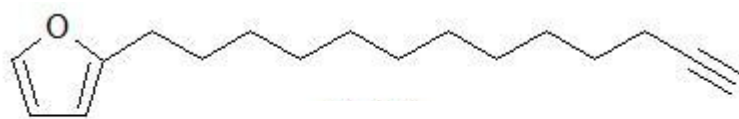
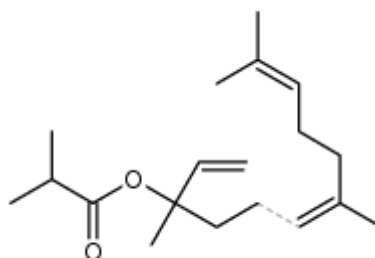


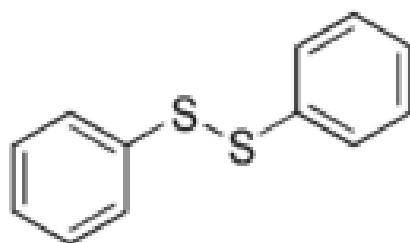
Figura 3. Estrutura química dos compostos A)liral; B)intermedeol.



A



B



C

Figura 4. Estrutura química dos compostos A) avocadinofurano; B) nerolidil-isobutirato; C) difenil-dissulfide.

Tabela 8. Possíveis compostos presentes nas sub-frações de 3 e 4 com sua fórmula química e índice de Kovats (IK).

Composto	Fórmula	IK	Sub-fração
ácido decanóico	C10H20O2	1366	4-1
cis-mentolactona	C10H18O2		
acetato cis-carvil	C12H18O2	1367	3-1/3-5
(2E)-undecenol	C11H22O		
hexenil-(3Z)-hexenoato	C12H20O2		
(E)- $\beta$ -damascenona	C13H18O	1384	4-1
isobornil propanoato	C13H22O2		
acetato de trans-mirtanol	C12H20O2		
$\delta$ -nonalactona	C9H16O2	1386	3-1
(Z)-isoeugenol	C10H12O2		
$\alpha$ -barbateno	C15H24	1407	3-3
longifoleno	C15H24		
isoamil octanoato	C13H26O2		
cis-prenil limoneno	C15H24	1445	3-1/3-4
capillin	C12H8O	1639	3-4
junicedranone	C15H24O	1665	4-2
liral	C13H22O2		
intermedeol (5 $\beta$ -10 $\alpha$ -eudesm-11en-4-ol)	C15H26O	1666	3-1/3-3/4-1/4-3/4-4/4-5
13-hidroxicariofileno	C15H24O	1667	3-4/3-5
álcool $\alpha$ -amil cinnamil	C14H20O	1683	3-4
acetato de cariofileno	C17H28O2	1701	4-2
8- $\alpha$ -acetoxielemo	C17H28O3		
(E) isovalencenol	C15H24O	1793	3-2/4-1/4-2
(E)-14-hexadecenal	C16H30O	1824	3-4
avocadinofurano	C17H26O		
(E)-nerolidil isobutirato	C19H32O2	1826	3-1/4-1/4-2/4-3/4-4/4-5
difenil-disulfide	C12H10S2		
nonadecano	C19H40		
dihidro-columelarina	C15H22O2	1900	3-2
retamina	C15H26N2O	1980	4-2/4-3/4-4
7-hidroxi-4-metil-cumarina	C10H8O3	1981	3-4/3-5
ácido linoléico	C18H32O2	2133	3-4/3-5
(1S)-1-etil-2-metilpropil 3,13-dimetilpentadecanoato	C26H46O2		
(2S,13S)-2,13-diacetoxiheptadecano	C21H40O4	2279	4-3/3-4/3-5
abietol	C20H32O	2401	4-4/4-5
2-naftalenol	C20H36O2	2422	3-4/3-5
perileno	C20H12	2703	3-1/3-4/3-5

Tabela 9. Compostos presentes na sub-fração 3-1 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

SUB-FRAÇÃO 3-1				
Composto	Fórmula	IK	Área (%)	TR (min)
acetato de trans-mirtanol	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1386	60,39	23,877
δ-nonalactona	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>			
cis-mentolactona	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>			
cis-carvil acetato	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	1367	39,6	24,183
(2E)-undecenol	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O			

Tabela 10. Compostos presentes na sub-fração 3-2 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

SUB-FRAÇÃO 3-2				
Composto	Fórmula	IK	Área (%)	TR (min)
nonadecano	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	1900	17,44	31,634
dihidro-columelarina	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>			
liral	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1666	13,37	28,496
intermedeol (5β-10α-eudesm-11en-4-ol)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O			
8-α-acetoxielemo	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	1793	56,8	30,242
(E)isovalencenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O			

Tabela 11. Compostos presentes na sub-fração 3-3 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

<b>SUB-FRAÇÃO 3-3</b>				
<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>IK</b>	<b>Área (%)</b>	<b>TR (min)</b>
liral	C13H22O2	1666	1,57	28,488
intermedeol (5 $\beta$ -10 $\alpha$ -eudesm-11en-4-ol)	C15H26O			
(Z)-isoeugenol	C10H12O2	1407	84,80	24,561
$\alpha$ -barbateno	C15H24			
Longifoleno	C15H24			
isoamil octanoato	C13H26O2	1445	7,00	25,152
cis-prenil limoneno	C15H24			
(1S)-1-etil-2-metilpropil 3,13-dimetilpentadecanoato	C26H46O2	2279	1,28	36,048
(2S,13S)-2,13-diacetoxiheptadecano	C21H40O4			
perileno	C20H12	2703	1,49	40,339
avocadinofurano	C17H26O	1826	1,46	30,672
(E)-nerolidil isobutirato	C19H32O2			
difenil-disulfide	C12H10S2			

Tabela 12. Compostos presentes na sub-fração 3-4 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

<b>SUB-FRAÇÃO 3-4</b>				
<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>IK</b>	<b>Área (%)</b>	<b>TR (min)</b>
isoamil octanoato	C13H26O2	1445	35,32	25,148
cis-prenil limoneno	C15H24			
(1S)-1-etil-2-metilpropil 3,13-dimetilpentadecanoato	C26H46O2	2279	6,22	36,05
(2S,13S)-2,13-diacetoxiheptadecano	C21H40O4			
perileno	C20H12	2703	9,2	40,343
capillin	C12H8O	1639	13,27	28,095
álcool $\alpha$ -amil cinnamil	C14H20O	1683	6,58	28,735
(E)-14-hexadecenal	C16H30O	1824	5,56	30,674
13-hidroxicariofileno	C15H24O	1667	5,73	28,492
7-hidroxi-4-metil-cumarina	C10H8O3	1981	5,45	32,631
ácido linoléico	C18H32O2	2133	5,41	34,424
2-naftalenol	C20H36O2	2422	7,25	37,553

Tabela 13. Compostos presentes na sub-fração 3-5 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

SUB-FRAÇÃO 3-5				
Composto	Fórmula	IK	Área (%)	TR (min)
cis-mentolactona	C10H18O2			
cis-carvil acetato	C12H18O2	1367	27,21	23,88
(2E)-undecenol	C11H22O			
(1S)-1-etil-2-metilpropil 3,13-dimetilpentadecanoato	C26H46O2	2279	3,04	36,05
(2S,13S)-2,13-diacetoxiheptadecano	C21H40O4			
perileno	C20H12	2703	5,36	40,343
13-hidroxicariofileno	C15H24O	1667	5,01	28,491
7-hidroxi-4-metil-cumarina	C10H8O3	1981	3,73	32,632
2-naftalenol	C20H36O2	2422	3,15	37,555
ácido linoléico	C18H32O2	2133	3,28	34,427
2-naftalenol	C20H36O2	2422	3,15	37,555

Tabela 14. Compostos presentes na sub-fração 4-1 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

SUB-FRAÇÃO 4-1				
Composto	Fórmula	IK	Área (%)	TR
liral	C13H22O2	1666	2,92	28,48
intermedeol (5 $\beta$ -10 $\alpha$ -eudesm-11-en-4-ol)	C15H26O			
8- $\alpha$ -acetoxielemo	C17H28O3	1793	6,98	30,233
(E)-isovalencenol	C15H24O			
avocadinofurano	C17H26O			
(E)-nerolidil isobutirato	C19H32O2	1826	1,67	30,666
difenil-disulfide	C12H10S2			
ácido decanóico	C10H20O2	1366	28,62	23,869
hexenil-(3Z)-hexenoato	C12H20O2			
(E)- $\beta$ -damascenone	C13H18O	1384	46,43	24,174
isobornil propanoato	C13H22O2			

Tabela 15. Compostos presentes na sub-fração 4-2 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

<b>SUB-FRAÇÃO 4-2</b>				
<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>IK</b>	<b>Área (%)</b>	<b>TR</b>
8- $\alpha$ -acetoxielemo	C17H28O3	1793	54,84	30,241
(E)-isovalencenol	C15H24O			
avocadinofurano	C17H26O	1826	2,1	30,664
(E)-nerolidil isobutirato	C19H32O2			
difenil-disulfide	C12H10S2			
junicedranona	C15H24O	1665	4,44	28,47
acetato de cariofileno	C17H28O2	1701	21,52	28,992
retamina	C15H26N2O	1980	2,01	32,618

Tabela 16. Compostos presentes na sub-fração 4-3 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

<b>SUB-FRAÇÃO 4-3</b>				
<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>IK</b>	<b>Área (%)</b>	<b>TR</b>
liral	C13H22O2	1666	6,7	28,483
Intermedeol (5 $\beta$ -10 $\alpha$ -eudesm-11en-4-ol)	C15H26O			
avocadinofurano	C17H26O	1826	10,12	30,663
(E)-nerolidil isobutirato	C19H32O2			
difenil-disulfide	C12H10S2			
retamina	C15H26N2O	1980	8,07	32,617

Tabela 17. Compostos presentes na sub-fração 4-4 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

<b>SUB-FRAÇÃO 4-4</b>				
<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>IK</b>	<b>Área (%)</b>	<b>TR</b>
liral	C13H22O2	1666	13,38	28,481
intermedeol (5 $\beta$ -10 $\alpha$ -eudesm-11en-4-ol)	C15H26O			
avocadinofurano	C17H26O	1826	12,74	30,667
(E)-nerolidil isobutirate	C19H32O2			
difenil-disulfide	C12H10S2			
retamina	C15H26N2O	1980	10,72	32,621
abietol	C20H32O	2401	10,89	37,338

Tabela 18. Compostos presentes na sub-fração 4-5 com seus respectivos índices de Kovats, área (%) e tempos de retenção (min).

<b>SUB-FRAÇÃO 4-5</b>				
<b>Composto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>IK</b>	<b>Área (%)</b>	<b>TR</b>
liral	C13H22O2	1666	12,68	28,482
intermedeol (5 $\beta$ -10 $\alpha$ -eudesm-11en-4-ol)	C15H26O			
avocadinofurano	C17H26O	1826	12,75	30,666
(E)-nerolidil isobutirate	C19H32O2			
difenil-disulfide	C12H10S2			
abietol	C20H32O	2401	11,67	37,228

## Discussão

Os resultados encontrados mostram que extratos etanólico e hexânico de folhas de IB 151239 apresentam efeito fungicida sobre o fungo simbiote mutualista das cortadeiras. A simbiose formigas - *L. gongylophorus* interfere muito no controle dessas importantes pragas, sendo que o uso de um produto com um efeito em ambos os lados do mutualismo será de grande valor para o controle mais efetivo desses insetos. Na verdade, o alvo principal de combate de cortadeiras é o elemento reprodutivo, ou seja, a rainha. No entanto, a eliminação do fungo e de operárias compromete a sobrevivência do formigueiro.

Ao oferecer à colônia um produto que possua um efeito fungicida, haveria uma inibição do crescimento do fungo simbiote, o que provocaria uma competição entre larvas e adultos pelo micélio como alimento.

Diversos trabalhos avaliando a atividade fungicida de extratos vegetais já foram realizados (Pagnocca et al. 1990, Ribeiro et al. 1998, Bueno et al. 2005, Almeida et al. 2007), entretanto, em sua maioria, não se conhece a substância causadora de tal efeito. A identificação desta (as) substância (as) é de essencial importância para a continuidade dos estudos nessa área.

Algumas substâncias isoladas de vegetais foram também já testadas no fungo simbiote das cortadeiras. A lignana sesamina, encontrada em diversas plantas, como o *Sesamum indicum* (gergelim) provoca completa inibição do desenvolvimento do fungo (Pagnocca et al. 1996), assim como o ácido anthranílico, presente em folhas de *Helietta puberula* (Almeida et al. 2007) e as aminas piperidina, dietilamina e pirrolidina (Pagnocca et al. 2006). Além desses, oito cumarinas extraídas de diversos vegetais já foram testadas com resultados de inibição de até 80% do crescimento do *L. gongylophorus* por algumas delas (Godoy et al. 2005).

A atividade fungicida encontrada no presente estudo foi mais acentuada na fração clorofórmica do extrato etanólico de IB 151239 e é semelhante aos resultados encontrados por alguns autores, que confirmaram a atividade antimicrobiana dessa fração do mesmo vegetal, contra bactérias gram positivas e negativas.

Apesar de não conhecermos ainda ao certo a substância fungicida presente nas folhas de IB 151239, dos compostos identificados nas sub-frações isoladas, o liral/intermediol e avocadinofurano/(E)-nerolidil isobutirato/difenil-disulfide são as

mais promissoras para a continuação dos estudos, uma vez que apareceram em maior frequência nas duas frações isoladas (3 e 4).

Com o composto identificado vários parâmetros precisam ser testados a fim de comprovar a eficiência do mesmo, como por exemplo, produzir a mesma atividade biológica usando a substância sintética. Além disso, é importante conhecer o tempo para o início dos efeitos fungicida e formicida, o tempo que a substância leva para interferir no forrageamento das operárias, ou seja, o tempo que o produto leva para promover a paralisação do corte. Para que um produto seja eficiente no controle de cortadeiras, uma das características mais relevantes é a rápida paralisação do corte. Esse tempo não pode ser muito prolongado para evitar a continuação do dano por essas pragas, como mostrado por Antunes et al. (2000) para a abamectina. Torna-se necessário ainda conduzir testes de eficiência com colônias no campo utilizando-se iscas impregnadas com a substância em diversas concentrações para se comprovar a possibilidade de seu emprego em larga escala. Também deve-se explorar possibilidades de outras formulações tais como, termonebulização, pós-secos etc.

Outro atributo importante de um produto para o combate às cortadeiras, se veiculado na forma de iscas granuladas, é a atratividade destas para as operárias. Desse modo, o produto é rapidamente distribuído por toda colônia. Em trabalhos realizados simultaneamente a este, a impregnação de folhas de IB 151239 em pó em iscas granuladas, resultou na alta atratividade dos grânulos em colônias de campo de *A. sexdens rubropilosa*. Vale ressaltar que essas iscas artesanais eram destituídas de polpa cítrica, de modo que o único atrativo foi o pó das folhas de IB 151239. Os resultados desses experimentos, inclusive, mostraram que essa isca foi mais atrativa que a comercial a base de polpa cítrica e sulfluramida, e essa atratividade durou até três meses após sua confecção, o que dá um indicativo da facilidade de armazenamento.

Com base no exposto, pode-se considerar como ferramentas promissoras no controle de cortadeiras alguns possíveis compostos extraídos de IB 151239 cuja identificação necessita ser completamente elucidada.

## Referências bibliográficas

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 469p. 2007.

ALMEIDA, R.N.A.; PENAFLORES, M.F.G.V.; SIMONTE, S.Y.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE FR. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Moller. *BioAssay*, v. 2, n. 2, 2007.

ANTUNES, A.C.; GUEDES, R.N.C.; DELLA LUCIA, T.M.C.; SERRÃO, J.E. Sub-lethal effects of abamectin suppressing colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Pest Management Science*, v.56. p.1059-1064. 2000.

BAILEY, A. V.; LUCCA I. I. A.; MOREU, J. P. Antimicrobial properties of some erucic acid-glicolic acid derivates. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 66, p. 77-85. 1993.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Eds.), *Introdução a métodos cromatográficos*. 7<sup>th</sup> ed. Unicamp, Campinas. 1997.

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

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; ANJOS, N.; MOREIRA, D. D. O. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), *Formigas Cortadeiras*. Viçosa, MG: Folha de Viçosa. pp. 151-162, 1993.

FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T., TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 5–51, 2001.

FOWLER, H.G. Heterogeneidade nas relações formiga-planta. In: Encontro de Mirmecologia, 9, Viçosa, 1989. *Anais...Viçosa*, p.42-44, 1989.

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

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

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. *The Ants*. Berlin: Springer-Verlag. 772 p. 1990.

KJAER, A.; OGAARD M. J.; MAEDA Y. Seed volatiles within the family Tropaeolaceae. *Phytochemistry*, v. 17, p. 1285-1287.1978.

LEITÃO, G.G.; SOUZA, P.A.; MORAES, A.A.; BROWN, L. Step-Gradient CCC Separation of Phenylpropanoid and Iridoid Glycosides from Roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28, p. 2053–2060, 2005.

MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O.C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bulletin of Entomological Research*, v. 80, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C.; RIBEIRO, S. B.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Journal of Chemical Ecology*, v. 22, n. 7, p. 1325-1330, 1996.

PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, F. C.; CRISÓSTOMO, F. R.; CASTRAL, T. C.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; BUENO, O. C.; BACCI JR., M.; HEBLING, M. J.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* and its symbiotic fungus. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 8, p. 17-23, 2006.

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

RIBEIRO, M. M. R. Toxicidade de extratos botânicos a formigas cortadeiras. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.

RICO GRAY, V.; OLIVEIRA, P. S. *The Ecology and Evolution of Ant-Plant Interactions*. Chicago: The University of Chicago Press. 331 p. 2007.

ROBERTSON, J.L.; RUSSELL, L.M.; PREISLER, H.K.; SAVIN, N.E. *Bioassays with Arthropods*. Taylor & Francis Group: CRC Press. 224 p. 2007.

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

SAS Institute. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008.

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 1, p. 5435–5440, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Bookman. 719 p. 2003.

TAKAHASHI-DEL-BIANCO, M. Toxicidade de extratos foliares de *Canavalia ensiformis* (L.) D. C. e de alguns princípios ativos de inseticidas comerciais para

operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Rio Claro, SP. UNESP, 173p. 2002.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. A utilização de plantas inseticidas no controle de saúvas. In: Encontro de Mirmecologia, 13, 1997, Ilhéus. Anais... Ilhéus: UESC. p. 121-123. 1997.

ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; HOELZEL, S.C.S.M.; PAGLIARIN, V.P.; MOREL, A.F. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. Acta Farmacologica Bonaerense, v.22, n. 2, p. 159-162, 2003.

## Conclusões gerais

- Folhas de IB 151239 supridas às operárias de *A. sexdens rubropilosa* provocaram efeito subletal nas mesmas, de modo que houve redução na taxa de encapsulação e no número total de hemócitos no seu sistema imune;
- As implicações desses resultados apontam para maior fragilidade da colônia uma vez que a supressão do sistema imune predispõe a colônia a uma situação de maior risco. Isto pode ser explorado sob o ponto de vista do manejo integrado das cortadeiras;
- Os extratos etanólico e hexânico de IB 151239 provocaram efeito fungicida em *L. gongylophorus*, o simbionte mutualista das cortadeiras;
- A fração clorofórmica do extrato etanólico de folhas de IB 151239 demonstrou a maior atividade fungicida;
- O sub-fracionamento indicou possíveis substâncias fungicidas; dentre elas o liral/intermedeol e avocadinofurano/(E)-nerolidil isobutirato/difenil-disulfide que necessitam ser confirmadas e testadas biologicamente.