

**KARINA DIAS AMARAL**

**MECANISMO DE AÇÃO E EFICIÊNCIA DA AZADIRACTINA NO CONTROLE  
DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS**

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

Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2020**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A485m                   Amaral, Karina Dias, 1991-  
2020                    Mecanismo de ação e eficiência da azadiractina no controle  
das formigas-cortadeiras / Karina Dias Amaral. – Viçosa, MG,  
2020.

77 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Formiga-cortadeira - Controle biológico. 2. *Azadiractina indica*. 3. Pesticidas. 4. Nim. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.796

**KARINA DIAS AMARAL**

**MECANISMO DE AÇÃO E EFICIÊNCIA DA AZADIRACTINA NO CONTROLE  
DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS**

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

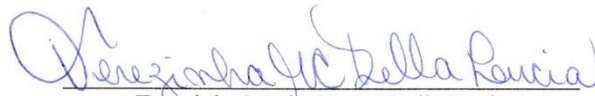
APROVADA: 27 de janeiro de 2020.

Assentimento:



---

Karina Dias Amaral  
Autora



---

Terezinha Maria Castro Della Lucia  
Orientadora

*Aos meus pais, João Batista e Edma,  
meus primeiros e maiores mestres*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ser minha luz e força em todos os momentos.

Aos meus pais, João Batista e Edma, por todo amor, incentivo e apoio. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os desafios e conquistas.

As minhas irmãs, Clarice e Janaína, minhas grandes amigas e fontes de inspiração, por todo cuidado, amor e carinho.

Aos meus familiares, Vó Otília, tios(as), primos(as) e cunhados, por toda torcida e apoio.

A Professora Terezinha, grande mestre e amiga, pela orientação, amizade, carinho e por ser um exemplo de profissional e de ser humano.

Aos membros da banca, Professores Danival de Souza, Marco Antonio Oliveira, José Eduardo Serrão e Doutora Angelica Plata, pela disponibilidade e sugestões valiosas para o enriquecimento deste trabalho.

A todos os amigos que passaram pelo Laboratório de Formigas-cortadeiras ao longo desses anos, especialmente, Lailla e Davi, pelo auxílio na execução deste trabalho. Ao Sr. Manuel pelo auxílio fundamental nas coletas das colônias e por toda amizade.

Aos colegas Luis Carlos Martinez e Leonardo Turchen pelo auxílio em algumas análises estatísticas.

Às equipes do Laboratório de Ultraestrutura Celular e Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia e seus coordenadores, Prof. José Eduardo Serrão e Prof. Leandro Licursi, pelo auxílio na execução de experimentos.

Aos grandes amigos que fiz em Viçosa, por tornarem meus dias muito mais alegres e leves. Em especial à minha amiga Karine, grande apoio nos últimos anos, e aos que mesmo distante se fazem presentes, Paulo, Larissa, Vanessa, Lissandra e Nayara.

Aos amigos de Ubá, pela torcida e carinho.

Aos colegas da pós-graduação pelo convívio nas aulas e nos momentos de descontração ao longo do curso.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de estudo.

Aos funcionários e professores da UFV, especialmente do Departamento de Entomologia pelo suporte e apoio ao longo do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma maneira contribuíram para essa conquista.

Muito obrigada!

*Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.*

*(Paulo Freire, 1987)*

## RESUMO

AMARAL, Karina Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2020. **Mecanismo de ação e eficiência da azadiractina no controle das formigas-cortadeiras.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia.

As formigas-cortadeiras são pragas em diversas culturas por causarem danos econômicos significativos com sua grande capacidade de desfolha e o fato de utilizarem partes frescas das plantas para nutrir o fungo que cultivam. Os métodos de controle mais utilizados contra esses insetos, apesar de eficientes, impactam negativamente o ambiente e os organismos não-alvo, o que incentiva a busca por moléculas alternativas para o controle desses insetos. Nesse sentido, investigou-se os efeitos da azadiractina, um metabólito secundário produzido pelo Nim, no controle de *Atta sexdens*, uma vez que essa substância é eficiente no controle de outros insetos e facilmente degradada no ambiente. Neste trabalho, avaliou-se o mecanismo de ação da azadiractina no sistema reprodutor das rainhas, bem como seus efeitos no crescimento e composição de macronutrientes do fungo cultivado pelas cortadeiras. Além disso, uma isca à base desse composto foi desenvolvida e avaliou-se sua eficácia, tanto na sobrevivência quanto em atividades como o forrageamento e a remoção de lixo dos ninhos. Ao nível reprodutivo, a azadiractina reduziu a capacidade de oviposição das rainhas e os ovos chegaram ao oviduto das fêmeas menos desenvolvidos e com baixa deposição de proteínas de reserva. Além disso, a substância provocou redução na síntese de vitelogeninas no corpo gorduroso, que é uma precursora das proteínas presentes no vitelo dos ovos. Em relação ao fungo mutualístico, a azadiractina inibiu seu desenvolvimento reduzindo a quantidade de hifas formadas. A sua composição de macronutrientes, por outro lado, não foi afetada. A isca contendo a azadiractina como ingrediente ativo se mostrou atrativa e eficiente no controle das cortadeiras, ao reduzir a atividade de forrageamento e a remoção de lixo dos ninhos, o que culminou com a morte de todas as colônias testadas. A elucidação do mecanismo de ação da azadiractina na capacidade reprodutiva das rainhas, bem como seus efeitos em outros parâmetros da colônia, como no desenvolvimento do fungo simbiote e em atividades cruciais como o forrageamento e a limpeza do ninho indicam potencial de utilização desse composto no controle das formigas-cortadeiras. Além disso, o desenvolvimento da isca artesanal à base de azadiractina fornece indicativos para uma forma de veiculação do composto nos ninhos de cortadeiras, devido à sua atratividade e eficiência.

Palavras-chave: Attini. Azadiractina. Biopesticidas. Controle de pragas. Nim.

## ABSTRACT

AMARAL, Karina Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2020. **Acting mechanism and efficiency of azadirachtin in the control of leaf-cutting ants.** Adviser: Terezinha Maria Castro Della Lucia.

Leaf-cutting ants are severe pests in many crops because they cause significant economic damage with their great defoliation capacity and the fact that they use fresh parts of the plants to nourish the fungus they grow. The most used control methods against these insects, the use of toxic baits, although efficient, negatively impact the environment and non-target organisms, which encourages the search for alternative molecules to control these insects. We investigated the effects of azadiractin, a secondary metabolite produced by Neem, to control *Atta sexdens*, since this substance is efficient in controlling other insects and easily degraded in the environment. In addition, a bait based on this compound was developed and its efficacy was evaluated, both in survival and in activities such as foraging and waste removal. At the reproductive level, azadiractin reduced the oviposition capacity of the queens and the eggs reached the female oviduct less developed and with low deposition of reserve protein. The substance caused a reduction in the synthesis of vitellogenins in the fat body, which is a precursor of the proteins present in egg yolk. Regarding the mutualistic fungus, azadiractin inhibited its development by reducing the amount of hyphae formed. Its macronutrient composition, on the other hand, was not affected. Baits containing azadiractin as an active ingredient proved to be attractive and efficient in the control of the leaf-cutting ants, reducing foraging activity and the removal of waste from the nests, which resulted in the death of all colonies tested. The elucidation of the mechanism of action of azadiractin on the reproductive capacity of queens, as well as its effects on other parameters of the colony, such as symbiotic fungus development and crucial activities such as foraging and nest cleaning, indicate a great potential for the use of the compound in the control of leaf-cutting ants. In addition, the development of azadiractin-based artisanal bait provides indications for a form of conveying the product in nests due to its attractiveness and efficiency.

Keywords: Attini. Azadirachtin. Biopesticides. Neem. Pest control.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	12
1.1	Formigas-cortadeiras .....	12
1.2	Reprodução e desenvolvimento.....	12
1.3	Fungo simbiote .....	13
1.4	Azadiractina.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
	REFERÊNCIAS .....	17
	CAPÍTULO I – AZADIRACTIN IMPAIRS EGG PRODUCTION IN <i>Atta sexdens</i> LEAF-CUTTING ANT QUEENS.....	20
1	INTRODUCTION.....	23
2	MATERIAL AND METHODS .....	24
2.1	Insect collection and maintenance.....	24
2.2	Insecticide.....	25
2.3	Effects of azadirachtin on oviposition.....	25
2.4	Histopathological analysis.....	25
2.5	Total protein and vitellogenin quantification .....	26
2.6	ELISA.....	26
2.7	Statistics.....	27
3	RESULTS.....	27
3.1	Number of eggs and oviposition probability .....	27
3.2	Histopathological findings .....	27
3.3	Total protein and vitellogenin contents .....	27
4	DISCUSSION .....	28
5	CONCLUSIONS .....	29
	REFERENCES .....	30

CAPÍTULO II – AÇÃO DA AZADIRACTINA CONTRA O FUNGO MUTUALÍSTICO DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS .....	38
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Manutenção das colônias.....	42
2.2 Obtenção dos isolados do fungo.....	42
2.3 Pesticida.....	42
2.4 Efeito no desenvolvimento do fungo.....	43
2.5 Quantificação dos macronutrientes e teor de umidade do fungo .....	43
2.6 Análises estatísticas .....	46
3 RESULTADOS .....	46
3.1 Efeito no desenvolvimento do fungo.....	46
3.2 Composição dos macronutrientes e teor de umidade .....	46
4 DISCUSSÃO.....	48
5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS .....	51
CAPÍTULO III – AÇÃO DA ISCA GRANULADA DE AZADIRACTINA NAS COLÔNIAS DE FORMIGAS-CORTADEIRAS .....	58
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Formulação da isca de azadiractina.....	62
2.2 Manutenção das colônias.....	62
2.3 Ação da isca de azadiractina no forrageamento das operárias .....	62
2.4 Ação da azadiractina na remoção de lixo pelas operárias .....	63
2.5 Observação da eficácia da isca nas colônias .....	63
2.6 Análises estatísticas .....	63
3 RESULTADOS .....	64
3.1 Ação da azadiractina nas atividades de forrageamento e descarte de lixo .....	64

3.2 Eficácia da isca de azadiractina nas colônias .....	64
4 DISCUSSÃO .....	65
5 CONCLUSÕES .....	68
REFERÊNCIAS .....	69
CONCLUSÕES GERAIS .....	77

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Formigas-cortadeiras

O hábito de cultivar fungos surgiu em Attini há 60-50 milhões de anos, o que teria resultado na dominância ecológica do grupo (SCHULTZ; BRADY, 2008). Há cerca de 15-10 milhões de anos as formigas-cortadeiras, gêneros *Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr, se especializaram no corte de partes vivas das plantas para suprir o fungo (SCHULTZ; BRADY, 2008) o que possibilitou a exploração de um novo nicho nutricional proporcionando o sucesso evolutivo dessas formigas, que são consideradas as mais derivadas da tribo (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

Por outro lado, o corte de partes vivas das plantas pelas cortadeiras conferiu a esses insetos o status de praga nos setores agrícolas e florestais, causando danos econômicos significativos em diversas culturas (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

*Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) conhecida popularmente como saúva-limão, é uma das espécies de cortadeiras consideradas praga-chave nos cultivos de *Eucalyptus* L'Hér no Brasil. Essa espécie está distribuída por todos os estados da região sudeste, além do Mato Grosso, Goiás e Paraná (DELABIE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

As colônias de *Atta sexdens* são monogínicas, ou seja, possuem uma única rainha durante todo seu ciclo de vida e, na fase adulta, podem possuir milhões de operárias distribuídas nas diversas castas (ARAÚJO et al., 2011).

## 1.2 Reprodução e desenvolvimento

O ciclo de vida das colônias de formigas-cortadeiras inicia-se com a produção de formas aladas (machos e fêmeas) que revoam da colônia de origem para o voo nupcial. As fêmeas fecundadas iniciam a escavação do ninho e o estabelecimento da nova colônia carregando em sua espermateca os espermatozoides dos machos que a fecundaram; esses machos morrem após a cópula (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Cinco a seis dias após a fundação do ninho, as rainhas iniciam a oviposição (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Os ovos dos insetos são constituídos, de forma geral, por oócito, citoplasma, germoplasma posterior e vitelo. O vitelo é rico em proteínas e lipídeos. As proteínas presentes nos ovos são sintetizadas principalmente no corpo gorduroso e são chamadas de vitelogeninas (CHAPMAN, 2013).

A vitelogenina é a principal fonte de nutrientes do embrião e podem estar associadas a outros aspectos como a divisão de trabalho e diferenciação de castas em insetos eussociais (ROBINSON; VARGO, 1997). Portanto, fatores que afetam a produção dessa proteína implicam diretamente no sucesso reprodutivo da rainha e no funcionamento da colônia.

Em torno de 24 dias após a oviposição, as primeiras larvas começam a emergir e, depois de passarem pelo estágio pupal, atingem a idade adulta entre 62-66 dias após a eclosão do ovo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

### 1.3 Fungo simbiote

As Attini cultivam basicamente dois gêneros de fungos, *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (Basidiomycota: Lepiotaceae), que são muito próximos filogeneticamente (DELLA LUCIA; DE SOUZA, 2011; JOHNSON, 1999). A espécie cultivada pelas cortadeiras já foi classificada de diferentes maneiras, porém, atualmente é considerada como *Leucoagaricus gongylophorus* (FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI, 2011).

A transmissão desse fungo ocorre de forma vertical, ou seja, as rainhas virgens carregam de seus ninhos de origem uma porção do fungo para o cultivo no novo ninho a ser estabelecido (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI, 2011; WEBER, 1972), o que garante a manutenção de uma única espécie cultivada pelas formigas-cortadeiras (MIKHEYEV; MUELLER; ABBOT, 2010).

As formigas-cortadeiras possuem um eficiente mecanismo de seleção do material vegetal, durante o corte e após o transporte para o ninho; podem rejeitar esse material quando detectam a presença de algum composto de ação formicida e/ou fungicida (DELLA LUCIA et al., 1995; SANTANA; COUTO, 1990; VENDRAMIN; SILVEIRA NETO; CERIGNONI, 1995). Além disso, o fungo simbiote parece indicar certa preferência por determinados substratos vegetais, porém, ainda é pouco conhecido o mecanismo pelo qual o fungo sinaliza essa preferência para a formiga (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009). O fungo mutualista produz enzimas destoxificativas, que agem nos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, como os compostos fenólicos, que provêm a deterrência alimentar nas formigas ao mesmo tempo em que inibem o crescimento do jardim de fungo (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985; SCHIØTT et al., 2008). Essas enzimas pertencem ao grupo das polifenoloxidasas e do subgrupo das lacases (NICHOLS-ORIAN, 1991).

A ação das enzimas destoxificativas, porém, só é possível graças ao mutualismo entre a formiga e o fungo. De Fine Licht et al. (2013) demonstraram que, como o jardim de fungo

possui enzimas mais ativas em sua porção central, a ação dessas enzimas nas porções onde o material vegetal é depositado, só é possível devido à deposição de fezes pelas formigas nesses locais. Esses autores observaram que as operárias ingerem as enzimas, porém essas não são digeridas, e passam intactas pelo intestino. Além disso, esse transporte de enzimas feito pelas formigas certamente favorece o acesso das hifas a proteínas e carboidratos presentes nas folhas.

#### 1.4 Azadiractina

Existem diversas plantas que produzem metabólitos secundários com ação inseticida. A maioria desses compostos pertence ao grupo dos terpenóides, seguidos pelos alcaloides e pelos compostos fenólicos (BOULOGNE et al., 2012). Dentre os terpenoides, observa-se a azadiractina, do subgrupo dos tetranortriterpenoides, que é encontrada no Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Esse composto está presente em maiores concentrações nas sementes da planta, apesar de existirem algumas dessas moléculas ativas nas folhas (MORDUE; NISBET, 2000).

Essa substância apresenta como principais efeitos a deterrência alimentar, a regulação do crescimento e a inibição da reprodução em diversos grupos de insetos. A partir dessa ação principal, outros efeitos secundários, que serão abordados a seguir, são desencadeados, gerando impacto significativo no fitness dos insetos (MORDUE et al., 1998).

A azadiractina é considerada potente inibidor de alimentação em muitos insetos, como as lagartas dos gêneros *Spodoptera* e *Heliothis* (Lepidoptera) (BLANEY et al., 1990). Além disso, esse composto possui efeitos antialimentares secundários, que surgem após o contato ou ingestão da substância (MORDUE; NISBET, 2000). Essa inibição alimentar, causada pela azadiractina, ocorre devido à redução na percepção dos fagoestimulantes por quimiorreceptores (MORDUE et al., 1998). Além disso, a azadiractina provoca efeitos antialimentares secundários que promovem distúrbios fisiológicos, como a dificuldade do transporte do alimento através do intestino médio e a inibição da produção das enzimas digestivas (CHAUDHARY, 2017; SCHMUTTERER, 1985).

Com relação à regulação do crescimento, a azadiractina promove disrupção do sistema endócrino, resultando em ecdises incompletas e desenvolvimento inadequado das formas jovens. A substância age bloqueando a liberação de peptídeos neurosecretores que regulam a síntese e liberação dos ecdisteroides e do hormônio juvenil (MORDUE et al., 1998). A azadiractina bloqueia a liberação dos hormônios protoracicotrópicos (HPTT) que são responsáveis pelo controle da glândula protorácica; esta, por sua vez, secreta a ecdisona, responsável pelo desencadeamento da muda e formação de uma nova cutícula, exercendo papel

chave na ecdise dos insetos (MORDUE; NISBET, 2000). Evidências demonstram que a azadiractina também pode interferir direta ou indiretamente na expressão das enzimas que catalizam a última etapa de transformação da ecdisona no hormônio ativo 20-hidroxiecdisona, pois essas não estavam presentes em pupas de *Spodoptera litura* tratadas com esse composto (HUANG et al., 2004; MORGAN, 2009).

A glândula protorácica, além de secretar ecdisona, também controla a liberação de hormônio juvenil pelas *corpora allata*, hormônio que tem ação fundamental na regulação da metamorfose e na reprodução dos insetos (CHAUDHARY, 2017; MORDUE; NISBET, 2000).

No aspecto reprodutivo a azadiractina inibe a oogênese e a síntese de ecdisteroides ovarianos nas fêmeas de diversos insetos (CHAUDHARY, 2017). Em *Anopheles stephensi* a azadiractina também interrompeu a taxa de oviposição das fêmeas, resultante do completo bloqueio da ovogênese e da formação do envelope vitelínico durante a vitelogênese, bem como da degradação das células foliculares (LUCANTONI et al., 2006). Essa ação da azadiractina na oviposição também já foi relatada em fêmeas de outros insetos como, mosca-branca, mosquitos do gênero *Culex* e besouros do gênero *Melolontha* (LYNN et al., 2010; SU; MULLA, 1998; WAGENHOFF; BLUM; DELB, 2016).

O decréscimo na taxa de oviposição também pode estar associado à redução na síntese de vitelogenina, como foi demonstrado em fêmeas de *Labidura riparia* (Dermaptera) e em *Chrysoperla carnea* (Neuroptera) em que a azadiractina afetou o acúmulo dessas proteínas nos ovos, causando o efeito negativo na oviposição desses insetos (MEDINA et al., 2004; SAYAH et al., 1996).

Na cigarrinha *Nilaparvata lugens*, além da inibição da síntese de vitelogenina, a azadiractina inibiu a ação da acetilcolinesterase, que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Essa inibição promove o acúmulo desse neurotransmissor na sinapse, fazendo com que a membrana pós-sináptica permaneça em constante estimulação, ocasionando um desequilíbrio no sistema neuromuscular (SENTHIL NATHAN et al., 2008). Esse bloqueio na atividade da acetilcolinesterase também já foi relatado em larvas e adultos do besouro *Tribolium castaneum*, em que se observou que o sítio de ligação da azadiractina com a acetilcolinesterase não é específico e essa molécula pode se ligar a vários pontos da enzima e não somente ao seu sítio ativo (SAMI et al., 2016).

Todos esses efeitos da azadiractina parecem derivar da ação dessa substância ao nível celular e na síntese de proteínas (MORGAN, 2009). A azadiractina interfere na polimerização da tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos durante a divisão celular (SALEHZADEH et al., 2003). Como a formação dos microtúbulos é essencial durante a mitose e a meiose, é

provável que a principal ação da azadiractina seja nos tecidos que sofrem divisão celular mais frequentemente, como os discos imaginais das larvas, o corpo gorduroso e os tecidos reprodutivos (MORDUE, 2004; MORGAN, 2009).

Além dos efeitos na divisão celular, a azadiractina também inibe a transcrição de alguns genes associados à proteção das células contra o estresse oxidativo (ASADUZZAMAN et al., 2016), bem como induz a apoptose em células de alguns insetos (HUANG et al., 2013; SHAO et al., 2016).

Por fim, ressalta-se que a azadiractina, além de possuir diferentes modos de ação, é considerada um biopesticida de baixa toxicidade a mamíferos que é degradado facilmente no ambiente, características muito importantes em uma molécula que se pretende utilizar no controle de insetos (ISMAN, 2006).

Diante do grande potencial da azadiractina como agente inseticida, seus efeitos nos diferentes âmbitos de uma colônia de formiga-cortadeira ainda foram pouco explorados e devem ser melhor compreendidos para que essa substância possa vir a ser usada no controle desses insetos.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar os efeitos da azadiractina no âmbito reprodutivo das rainhas de *Atta sexdens*, considerando seus efeitos na oviposição, no desenvolvimento dos ovócitos e no seu conteúdo de proteínas de reserva.

Analisar os efeitos da azadiractina no desenvolvimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivado pelas formigas-cortadeiras, além de verificar os efeitos dessa substância na sua composição nutricional do fungo simbiote.

Por fim, objetiva-se desenvolver uma isca contendo azadiractina e avaliar seu efeito em aspectos da colônia como o comportamento de forrageamento e de limpeza do ninho, além de verificar sua eficácia na mortalidade das colônias de formigas-cortadeiras.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M.S et al. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: Della Lucia, T.M.C (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 173-188.
- ASADUZZAMAN, M. et al. Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 1, p. 1–4, 2016.
- BLANEY, W. M. et al. Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, n. 2, p. 149–160, 1990.
- BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325–347, 2012.
- CHAPMAN, R.F.; SIMPSON, S.J.; DOUGLAS, A.E. **The Insects: Structure and Function**, 5th Edition, Cambridge University Press, 2013.
- CHAUDHARY, S. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2017.
- COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, n. 4728, p. 895–899, 1985.
- DE FINE LICHT, H. H. et al. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 2, p. 583–587, 2013.
- DELABIE, J. H. C. et al. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 80–101.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; DE SOUZA, D.J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 13–26.
- DELLA LUCIA, T. M. C. et al. Avaliação da não preferência da formiga-cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 19(1), p. 92–99, 1995.
- DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.
- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycological Research**, v. 98, n. 8, p. 884–888, 1994.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1990.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. New York, NY: W. W. Norton & Company, 2009.

- HUANG, J. et al. The mitochondria-mediate apoptosis of lepidopteran cells induced by azadirachtin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–15, 2013.
- HUANG, Z. et al. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 80, n. 2, p. 85–93, 2004.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45–66, 2006.
- JOHNSON, J. Phylogenetic relationship within *Lepiota sensu lato* based on morphological and molecular data. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 443–458, 1999.
- LUCANTONI, L. et al. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Tissue and Cell**, v. 38, n. 6, p. 361–371, 2006.
- LYNN, O. M. et al. Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweetpotato whitefly and root-knot nematode. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 598–604, 2010.
- MEDINA, P. et al. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. **Journal of economic entomology**, v. 97, n. 1, p. 43–50, 2004.
- MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Comparative dating of Attine ant and Lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. **The American Naturalist**, v. 175, n. 6, p. E126–E133, 2010.
- MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 294, 2000. p. 615–632.
- MORDUE, A. J. et al. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science**, v. 54, n. 3, p. 277–284, 1998.
- MORDUE, A. J. Present concepts of the mode of action of azadirachtin from neem. In: KOUL, O.; WAHAB, S. (Eds.). **Neem: today and in the new millenium**. Kluwer Academic: Dordrecht, p. 229–242, 2004.
- MORGAN, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4096–4105, 2009.
- NICHOLS-ORIAN, C. Condensed tannins, attine ants, and the performance of a symbiotic fungus. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n. 6, p. 1177–1195, 1991.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Ant diversity in an area of the Amazon Forest in Acre, Brazil. **Sociobiology**, v. 54, n. 1, p. 243–267, 2009.
- PAGNOCCA, F.C; RODRIGUES, A., BACCI, M.J. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 262–283.
- ROBINSON, G. E.; VARGO, E. L. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera:

gonadotropin and behavioral pacemaker. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 35, n. 4, p. 559–583, 1997.

SALEHZADEH, A. et al. The antimetabolic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 7, p. 681–689, 2003.

SAMI, A. J. et al. Effect of crude neem (*Azadirachta indica*) powder and azadirachtin on the growth and acetylcholinesterase activity of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 48, n. 3, p. 881–886, 2016.

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

SAYAH, F. et al. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera). **Tissue and Cell**, v. 28, n. 6, p. 741–749, 1996.

SCHIØTT, M. et al. Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 40, 2008.

SCHMUTTERER, H. Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions? **Zeitschrift Für Angewandte Entomologie**, v. 100, n. 5, p. 468–475, 1985.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.

SENTHIL NATHAN, S. et al. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 244–250, 2008.

SHAO, X. et al. Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/AKT/TOR pathways by azadirachtin A in *Spodoptera litura* Cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.

SU, T.; MULLA, M. S. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 14, n. 2, p. 204–9, 1998.

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

WAGENHOFF, E.; BLUM, R.; DELB, H. Sublethal effects of NeemAzal®-T/S on cockchafers, *Melolontha* spp. (Col., Scarabaeidae), with a special focus on application timing and beetles' recovery capabilities. **Phytoparasitica**, v. 44, n. 1, p. 125–138, 2016.

WEBER, N. A. **Gardening ants, the attines**. American Philosophical Society, Philadelphia, 1972.

**CAPÍTULO I –  
AZADIRACHTIN IMPAIRS EGG PRODUCTION IN *Atta sexdens* LEAF-  
CUTTING ANT QUEENS**

## CAPÍTULO I

[Published in: *Environmental Pollution* 243 (2018) 809-814]

Original Research Paper

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.066>

Karina Dias Amaral<sup>a</sup>; Luis Carlos Martínez<sup>b</sup>; Maria Augusta Pereira Lima<sup>c</sup>; José Eduardo Serrão<sup>b</sup>; Terezinha Maria Castro Della Lucia<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Entomologia, Federal Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil; [karina\\_damaral@yahoo.com.br](mailto:karina_damaral@yahoo.com.br)

<sup>b</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil; [lc.martinez@outlook.com](mailto:lc.martinez@outlook.com); [jeserrao@ufv.br](mailto:jeserrao@ufv.br)

<sup>c</sup>Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil; [gutaufv@gmail.com](mailto:gutaufv@gmail.com); [tdlucia@ufv.br](mailto:tdlucia@ufv.br)

### Highlights

- Leaf-cutting ants are defoliating pests responsible for economic damage to crops.
- Sublethal effects of azadirachtin were investigated for control of *Atta sexdens*.
- Oviposition, histopathology, and protein content were evaluated.
- Azadirachtin drastically reduced oviposition.
- Azadirachtin decreased vitellogenin synthesis in the fat body.

## RESUMO

As formigas-cortadeiras são pragas muito importantes em setores florestais e agrícolas da região Neotropical. Em *Atta sexdens*, as colônias podem apresentar milhões de indivíduos que vivem em uma sociedade altamente complexa em que o papel de reproduzir é desempenhado por uma única rainha. Os métodos de controle só alcançam sucesso quando a rainha também é atingida, mas são poucos os estudos que avaliam os efeitos letais ou subletais de substâncias tóxicas nesses indivíduos. A azadiractina é considerada um eficiente biopesticida no controle de muitos insetos, porém, sua ação nas formigas-cortadeiras ainda é pouco explorada. Este estudo demonstrou como esse composto afeta a oviposição das rainhas de *A. sexdens* por reduzir o desenvolvimento de seus ovos pela baixa deposição de proteínas de reserva, uma vez que a azadiractina reduziu a síntese de vitelogeninas, precursora das principais proteínas presentes no vitelo. Esse efeito negativo que a azadiractina provocou na capacidade reprodutiva dessas rainhas indica um possível sucesso na utilização dessa substância no controle desses insetos.

**Palavras-chave:** Controle de formigas. Formicidae. Óleo de Nim. Vitelogenina. Vitelo.

## ABSTRACT

Leaf-cutting ants are important pests of forests and agricultural crops in the Neotropical region. *Atta sexdens* colonies can be composed of thousands of individuals, which form a highly complex society with a single reproductive queen. Successful control of this species is achieved only if the queen is affected. Few data are available on the lethal or sublethal effects of toxic compounds on leaf-cutting ant queens. Azadirachtin has been claimed as an effective biopesticide for insect control, but its action on leaf-cutting ants has been little explored. This study shows that azadirachtin affects oviposition in *A. sexdens* queens, impairing egg development by decreasing protein reserves. Azadirachtin inhibits the synthesis of vitellogenin, the major yolk protein precursor. The negative effects of azadirachtin on the reproduction of leaf-cutting ant queens suggest a potential use for the control of these insects.

**Keywords:** Ant control. Formicidae. Neem oil. Vitellogenin. Yolk.

## 1 INTRODUCTION

Leaf-cutting ants (Formicidae: Attini) are defoliating insects that cause damage to agricultural crops and forest areas in the Neotropical region. The ants cut fresh parts of plants to serve as substrate for the symbiotic fungi that they cultivate (Della Lucia and De Souza, 2011; Della Lucia et al., 2014; Britto et al., 2016).

In Brazil, *Atta sexdens* (Linnaeus) are found in the Southeast and Central regions (Delabie et al., 2011). Their colonies can contain millions of workers divided into various castes but have only one reproductive queen (monogyny) (De Souza et al., 2011).

The most common control method against leaf-cutting ants is the use of chemicals that kill foraging workers; thus, damage to crops is immediately interrupted (Forti et al., 2007). However, it is desirable that the active ingredient also causes the queen's death (Hölldobler and Wilson, 1990; Forti et al., 2000).

The complex structure of ant nests ensures the queen's performance, protecting her from natural enemies and other factors that might threaten her survival (Forti et al., 2011). Queens are usually located in secluded nest chambers, where a large number of workers feed and protect their queen (Hölldobler and Wilson, 2009). Even so, queens can be exposed to sublethal concentrations of toxic compounds applied for chemical control.

Although sublethal concentrations of insecticides do not cause high population mortality, they can significantly affect lifespan, fertility, communication, feeding, and oviposition (Lee, 2000). In eusocial insects, such as leaf-cutting ants, sublethal effects are even more important because, in these societies, individuals are closely related and the success of the colony depends on cooperation and labor division among members (Hölldobler and Wilson, 2009).

In a scenario where the damage of insecticides to the environment and to non-target organisms still needs mitigation (Desneux et al., 2007), the search for new molecules to control insect pests is important. Selective and biodegradable compounds, including "green pesticides," might be an alternative to reduce the use of synthetic insecticides on crops (Isman, 2006; Martínez et al., 2015). The action of plant secondary metabolites on the behavior and survival of leaf-cutting ants has been investigated (Isman, 2006; Britto et al., 2016)

Azadirachtin is a natural triterpenoid insecticide extracted from neem, *Azadirachta indica* Juss. (Sapindales: Meliaceae), that promotes feeding deterrence, growth regulation, and reproduction inhibition in many insects (Mordue et al., 1998; Mulla and Su, 1999). This

compound also affects oviposition in some insects (Sayah et al., 1996; Su and Mulla, 1999; Medina et al., 2004). In addition, azadirachtin has low toxicity to mammals and is rapidly degraded in the environment (Isman, 2006). Azadirachtin was shown to have non-toxic effects on cultured mouse cells but was toxic to *Spodoptera* cells (Reed and Majumdar, 1998).

The female reproductive tract of leaf-cutting ants consists of two ovaries with a pair of lateral oviducts that open into a common oviduct connected to the genital chamber (Antunes et al., 2002; Ortiz and Camargo-Mathias, 2006; Cardoso et al., 2008). Ovaries are composed of functional units, the ovarioles, which are responsible for the production of oocytes. The vitellarium is the largest portion of the ovariole, where oocyte maturation and yolk uptake occur (Bussador do Amaral and Machado-Santelli, 2009; Chapman, 2013). Insect yolk is composed of proteins and lipids. Yolk proteins are derived from vitellogenin, which is produced in the fat body, released into the hemolymph, and then transported to oocytes (Tufail and Takeda, 2008, Azevedo et al., 2011; 2016). Thus, the fat body and reproductive tract are important targets for compounds expected to affect reproduction.

This study evaluated the effects of azadirachtin on oviposition, ovary histology, and vitellogenin content in the fat body and hemolymph of *A. sexdens* queens.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Insect collection and maintenance**

*A. sexdens* queens were obtained from 6-month-old colonies with a 200 mL fungus garden in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The colony's early months are critical, as the queen has to work continuously with the help of few workers, requiring great energy expenditure. Moreover, in early colonies, queens lay many trophic eggs, which serve as food for herself and the offspring. On average, ants begin to forage and cultivate fungi after 87 days (Hölldobler and Wilson, 2009). These stress factors must be considered when carrying out experiments with *A. sexdens* queens to avoid that they influence the results. It is also very important to standardize the queens' age, a factor that affects oviposition rate. For this reason, we collected queens from 6-month-old colonies, as colonies were already well established and the queens were in full reproductive condition.

Colonies were maintained at  $25 \pm 5$  °C and  $75 \pm 5\%$  relative humidity under a photoperiod of 12 h in the Insectary of the Department of Entomology at the Federal University

of Viçosa, Brazil, according to the protocol established by Della Lucia and Moreira (1993). Colonies received fresh leaves of *Acalypha wilkesiana* Müll. (Euphorbiaceae) daily and water *ad libitum*.

## 2.2 Insecticide

The insecticide Azamax (12 g L<sup>-1</sup> azadirachtin), manufactured by E.I.D. Parry Ltd. (India), was purchased from DVA Especialidades (Brazil). The formulation is an emulsifiable concentrate. Azadirachtin belongs to the toxicological class III (moderately toxic) and the environmental hazard potential class IV (not harmful to the environment). Azamax is registered in Brazil by the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (no. 14807) and is certified internationally and in Brazil for use in organic crops.

## 2.3 Effects of azadirachtin on oviposition

Fifteen queens were collected and had their oviposition rate assessed. Five queens received 4 µL of a 1.2 mg mL<sup>-1</sup> azadirachtin on the thorax surface and were fed with a 1:1 (v/v) water and honey solution. Another set of five queens were fed a water and honey diet with 1.2 mg mL<sup>-1</sup> azadirachtin. The five remaining queens (control) were fed the liquid diet but were not exposed to azadirachtin either by topical application or by ingestion (Araújo et al., 1993). Diets were the same throughout the test period. The sublethal azadirachtin concentration of 1.2 mg mL<sup>-1</sup> (LC<sub>30</sub>, lethal concentration that kills 30% of the individuals) was determined from previous mortality tests with workers topically exposed to the insecticide. The same concentration was added to the diet because it was accepted by the ants in social immunity tests. Both treatment groups received the nominal exposure concentration of 1.2 mg mL<sup>-1</sup> azadirachtin; no measurements were performed to determine the actual concentration in each individual after exposure. Queens were individualized in plastic vials and maintained at 25 ± 5 °C and 75 ± 5% relative humidity in the dark. The number of eggs was counted every 12 h during 96 h. At each count, eggs were removed from the vials, according to Della Lucia et al. (1990).

## 2.4 Histopathological analysis

Fifteen *A. sexdens* queens were selected for analysis; five controls, five queens topically exposed to azadirachtin, and five queens fed a diet containing azadirachtin, as previously described in section 2.3. Queens were dissected in insect saline solution (0.1 M NaCl, 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) and their ovaries were fixed with Zamboni's fixative (Stefanini et al., 1967) for 12 h at 5 °C. Then, samples were dehydrated in a graded ethanol series (70%, 80%, 90%, and 95%), embedded in Historesin (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and sectioned at 4 µm thickness using a Leica RM2255 microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed using an Olympus BX-60 light microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

## 2.5 Total protein and vitellogenin quantification

Sixteen queens, eight control and eight topically treated with azadirachtin, were used for this analysis. Eight microliters of hemolymph was extracted from each queen. Subsequently, queens were dissected, and the fat body was removed. The hemolymph was diluted in 50 µL of distilled water; and the fat body, in 100 µL of distilled water. Samples were centrifuged at 10000 × *g* for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected, and total protein quantification was performed at 280 nm using a NanoDrop spectrophotometer .

## 2.6 ELISA

The vitellogenin content of the hemolymph and fat body was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, in a 96-well plate, 5 µg of total protein from the hemolymph or 20 µg of total protein from the fat body was diluted in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffered saline, pH 8.0, plus 0.05% (v/v) Tween (PBST) in a final volume of 100 µL, blocked with 3% (w/v) non-fat dry milk in distilled water, and incubated at 4 °C for 16 h. Mouse anti-vitellogenin antibody diluted 1:500 in PBST (Azevedo et al., 2011) was added to each well, and the plate was incubated for 2 h. After washing, horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma–Aldrich) diluted 1:9000 in PBST was added, and the plate was incubated for further 2 h. Peroxidase was revealed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution (Sigma–Aldrich) in 0.05 mol L<sup>-1</sup> phosphate–citrate buffer, pH 5.0, according to the manufacturer's instructions. The reaction was stopped with 20 µL of 5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution, and absorbance was measured at 490 nm.

## 2.7 Statistics

Oviposition data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honest significant difference test at the 5% significance level using SAS for Windows v. 9.1 (SAS Institute, USA, 2002). Cumulative oviposition was estimated by survival analysis, that is, by comparing multiple samples by the Kaplan–Meier test at the 5% significance level using Statistica v. 10 (StatSoft, USA). Student's t-test was used for pairwise comparisons of total protein and vitellogenin contents between treatment groups (GraphPad Prism v. 7.0, GraphPad, USA).

## 3 RESULTS

### 3.1 Number of eggs and oviposition probability

Azadirachtin exposure reduced the number of eggs laid by *A. sexdens* queens ( $F_{1,4} = 5.13$ ;  $P = 0.0355$ ), both by ingestion and topical application. Control queens laid a mean of 389.94 eggs, whereas queens exposed orally and topically to azadirachtin laid respectively 137.84 eggs and 95.82 eggs (Fig. 1). Azadirachtin treatment also reduced oviposition probability ( $\chi^2 = 213.8$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0.0001$ ). After 96 h, control queens showed an oviposition probability of 42%, whereas queens treated with azadirachtin (by ingestion or topical application) had an oviposition probability of only 4% (Fig. 2).

### 3.2 Histopathological findings

The number of mature eggs reaching the oviduct was lower in queens exposed to azadirachtin, by ingestion or topically, than in control queens. The ovaries of queens in the control group had follicles at different developmental stages, with those in the apical region of the vitellarium containing small oocytes and well-developed nurse cells and those in the basal region showing features of mature oocytes, rich in yolk and chorion (Fig. 3A). In contrast, in queens exposed to azadirachtin by ingestion or topical treatment, the oocytes that reached the oviduct were poorly developed, containing little yolk and no chorion (Fig. 3B and C).

### 3.3 Total protein and vitellogenin contents

We quantified the total protein and vitellogenin contents only in queens exposed topically to azadirachtin because the oviposition assay showed that topical and oral treatments had similar effects.

Azadirachtin decreased total protein content in the fat body ( $t = 2.225$ ;  $df = 14$ ;  $P = 0.0430$ ) (Fig. 4A). Total protein content in the hemolymph did not differ between control and treated queens ( $t = 1.165$ ;  $df = 14$ ;  $P = 0.2635$ ) (Fig. 4B).

Azadirachtin-treated queens had low vitellogenin content in the fat body compared to control queens ( $t = 2.329$ ;  $df = 14$ ;  $P = 0.035$ ) (Fig. 5A), but the vitellogenin content of the hemolymph did not differ between the two groups ( $t = 0.794$ ;  $df = 14$ ;  $P = 0.4404$ ) (Fig. 5B).

#### 4 DISCUSSION

Azadirachtin drastically reduces oviposition and fecundity in *A. sexdens* queens, an effect that had already been reported in females of other insects, such as whiteflies (Lynn et al., 2010), mosquitoes (*Culex* spp.) (Su and Mulla, 1998, 1999a,b), and beetles (*Melolontha* spp.) (Wagenhoff et al., 2016). Azadirachtin acts as an insect growth regulator through the neurosecretory–neuroendocrine pathway and perhaps other biological processes, including cell cycle regulatory pathways (Gilbert and Gill, 2010). The compound is also a feeding inhibitor, delaying development and growth, reducing fecundity and fertility, changing behavioral responses, and causing anomalies in insect eggs, larvae, and adults (Ventura and Ito, 2000; Zanuncio et al., 2016). In this study, azadirachtin decreased egg production by *A. sexdens* queens, an effect that can compromise the development and growth of the entire colony, as leaf-cutting ants are monogynous.

Histological analysis of the ovaries of queens treated with azadirachtin revealed immature eggs reaching the lateral oviduct, with little yolk and no chorion; these features are suggestive of low storage reserves, which may be due to deficient protein synthesis and/or uptake by oocytes. Our findings indicate that both processes might occur, because there was a reduction in the total protein content of the fat body, where proteins are synthesized and vitellogenin is produced in high amounts in reproductive females (Raikhel and Dhadialla, 1992), and there was no decrease in the total protein and vitellogenin contents of the hemolymph, which can indicate that proteins were not endocytosed by oocytes. In *Anopheles stephensi*, azadirachtin affects oviposition by inhibiting oogenesis, yolk uptake, and follicular cell degradation (Lucantoni et al., 2006). In *Labidura riparia* (Dermaptera) and *Chrysoperla*

*carnea* (Neuroptera), the compound reduces vitellogenin synthesis and accumulation in eggs (Sayah et al., 1996; Medina et al., 2004).

The decrease in total protein and vitellogenin contents in the fat body of *A. sexdens* queens exposed to azadirachtin might have been due to this compound's action on juvenile hormone synthesis. Vitellogenin synthesis is directly controlled by the action of the juvenile hormone on the fat body (Chapman, 2013). This hormone also controls vitellogenin sequestration from the hemolymph by oocytes (Raikhel and Dhadialla, 1992; Chapman, 2013). Juvenile hormone synthesis is regulated by neuropeptides produced by neurosecretory brain cells, such as allatotropins, peptides with stimulatory effects, and allatostatins, inhibitory neuropeptides (Kataoka et al., 1989; Woodhead et al., 1989). Allatostatins also block vitellogenin glycosylation in the fat body, inhibiting its release into the hemolymph (Martín et al., 1996). Azadirachtin has been reported to be allatoregulatory, altering the release and transport of allatotropins and allatostatins, which might affect juvenile hormone synthesis and, consequently, vitellogenin production (Mordue et al., 1998; Mordue and Nisbet, 2000). However, how azadirachtin acts on these neuropeptides and its impact on juvenile hormone synthesis still needs to be understood.

## 5 CONCLUSIONS

Azadirachtin affects the reproductive activity of *A. sexdens* queens, reducing oviposition and oocyte development by decreasing vitellogenin synthesis in the fat body.

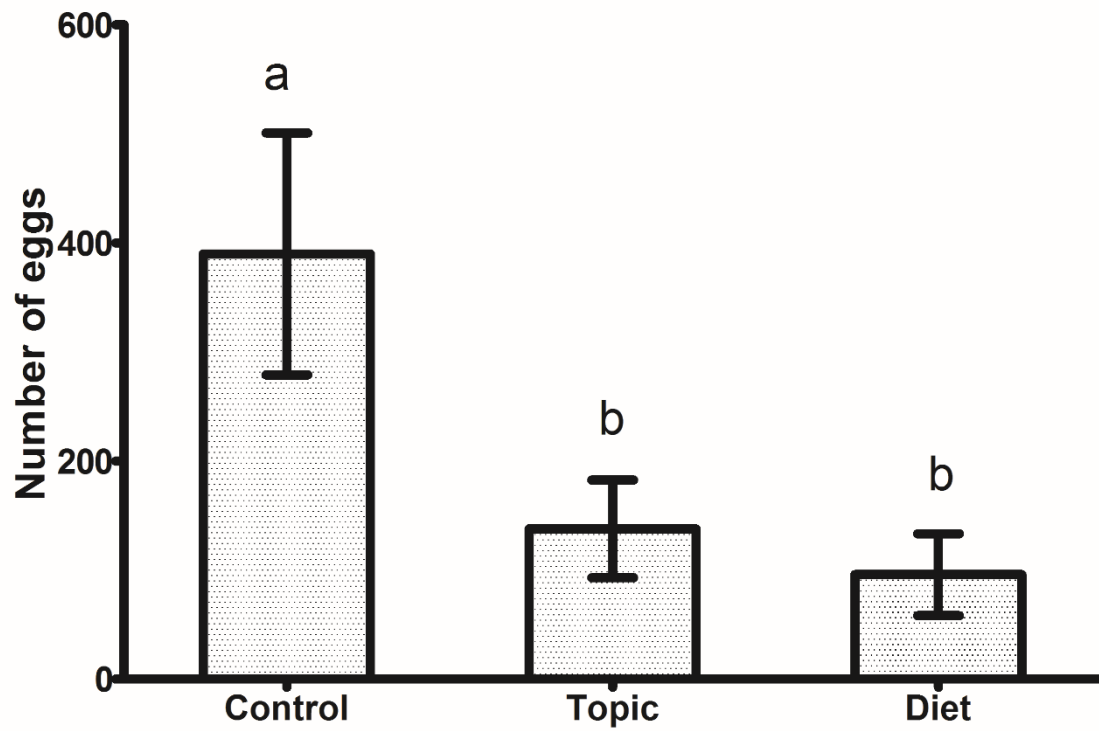
As only one queen is responsible for reproduction in leaf-cutting ants, our findings indicate that azadirachtin might have a high impact on colony fitness and thus is a potential molecule for the control of this insect pest.

## REFERENCES

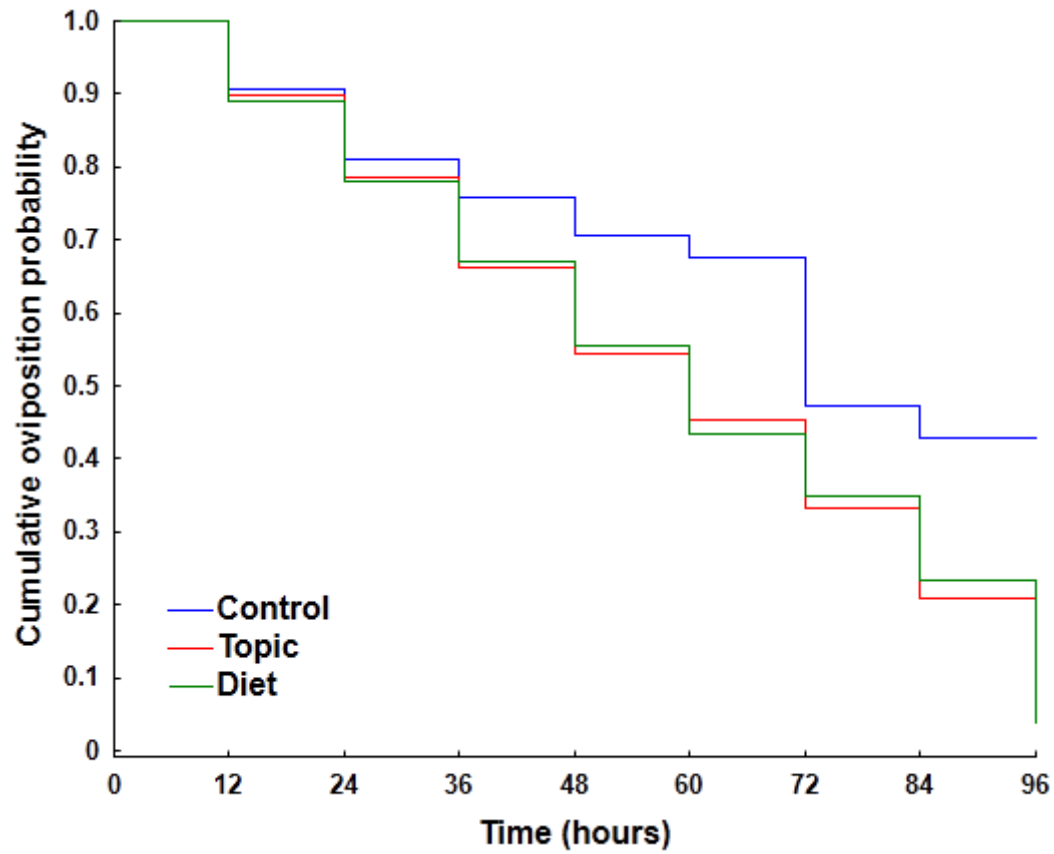
- Antunes, E.C., Serrão, J.E., Della Lucia, T.M.C., 2002. Morphology of the reproductive tract of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* queens (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 39, 269–279.
- Araújo, M.S., Della Lucia, T.M.C., 1993. Periodicidade de oviposição em rainhas de *Atta laevigata* F. Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. *Rev. Ceres* 40, 104–112.
- Azevedo, D.O., Paula, O. De, Zanuncio, J.C., Martinez, L.C., Eduardo, J., 2016. Juvenile hormone downregulates vitellogenin production in *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) sterile workers. *J. Exp. Biol.* 219, 103–108.
- Azevedo, D.O., Zanuncio, J.C., Delabie, J.H.C., Serrão, J.E., 2011. Temporal variation of vitellogenin synthesis in *Ectatomma tuberculatum* (Formicidae: Ectatomminae) workers. *J. Insect Physiol.* 57, 972–977.
- Britto, J.S. de, Forti, L.C., Oliveira, M.A. de, Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J. cola, Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R. da S., 2016. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* 3, 11–92.
- Bussador do Amaral, J., Machado-Santelli, G.M., 2009. Three-dimensional reconstruction of ovaries of leaf-cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa*) queens (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 53, 379–388.
- Cardoso, D.C., Fortes, J.C., Cristiano, M.P., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2008. Spermathecae and associated glands of the ants *Solenopsis saevissima* and *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Sociobiology* 52, 377–385.
- Chapman, R.F., 2013. *The insects: structure and function*, 5th edn. Elsevier, New York.
- Delabie, J.H.C., Alves, H.S.R., Reuss-Strenzel, M., Do Carmo, A.F.R., Nascimento, I.C., 2011. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, p. 80–101.
- Della Lucia, T.M.C., De Souza, D.J., 2011. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, p. 13–26.
- Della Lucia, T.M., Gandra, L.C., Guedes, R.N., 2014. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci.* 70, 14–23.
- Della Lucia, T.M.C., Moreira, D.D.O., 1993. Caracterização de ninhos. In: Della Lucia, T.M.C. (Ed.), *As Formigas Cortadeiras*. Folha de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, pp. 32–42.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Moreira, D.D.O., Bento, J.M.S., Dos Anjos, N., 1990. Egg-laying in *Atta sexdens rubropilosa* under laboratory conditions. In: Vander Meer, R. K., Jaffé, K., Cedeno, A. (Eds.). *Applied myrmecology, a world perspective*. San Francisco & Oxford: Westview Press, p. 173–179.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106.
- De Souza, D.J., Santos, J.F.L., Della Lucia, T.M.C., 2011. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Editora UFV, Viçosa, p.126-137.

- Forti, L.C., Andrade, A.P.P., Ramos, V.M., 2000. Biologia e comportamento de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae): implicações no seu controle. Ser. Tecn. IPEF, FCA/UNESP 13, 103–114.
- Forti, L.C., Moreira, A.A., Andrade, A.P.P., Castellani, M.A., Caldato, N., 2011. In: Della Lucia, T. M. C. (Ed.), Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Editora UFV, Viçosa, p.102-125.
- Forti, L.C., Pretto, D.R., Nagamoto, N.S., Padovani, C.R., Camargo, R.S., Andrade, A.P.P., 2007. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 50, 1149–1163.
- Gilbert, L.I., Gill, S.S., 2010. Insect control biological and synthetic agents. Academic Press-Elsevier.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 2009. The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies. Norton & Company, New York.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. The Ants, Harvard University Press.
- Isman, M.B., 2006. Botanical Insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51, 45–66.
- Kataoka, H., Toschi, A., Li, J.P., Carney, R.L., Schooley, D.A., Kramer, S.J., 1989. Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. Science 243, 1481–1483.
- Lee, C., 2000. Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review. J. Biosci. 11, 107–112.
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P., Habluetzel, A., 2006. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Tissue Cell 38, 361–371.
- Lynn, O.M., Song, W.G., Shim, J.K., Kim, J.E., Lee, K.Y., 2010. Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweetpotato whitefly and root-knot nematode. J. Appl. Biol. Chem. 53, 598–604.
- Martín, D., Piulachs, M.D., Bellés, X., 1996. Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach. Mol. Cell. Endocrinol. 121, 191–196.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2015. Bioactivity of six plant extracts on adults of *Demotispia neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Insect Sci. 15, 34.
- Medina, P., Budia, F., del Estal, P., Viñuela, E., 2004. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. J. Econ. Entomol. 97, 43–50.
- Mordue, A.J., Nisbet, A.J., 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. An. Soc. Entomol. Bras. 29, 615–632.
- Mordue, A.J., Simmonds, M.S.J., Ley, S. V., Blaney, W.M., Mordue, W., Nasiruddin, M., Nisbet, A.J., 1998. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. Pestic. Sci. 54, 277–284.
- Mulla, M. S. and T. Su., 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. J Am Mosq Control Assoc. 15, 133-152.
- Ortiz, G., Camargo-Mathias, M.I., 2006. Morpho-physiological differences of the spermatheca of Attini ants (Hymenoptera: Myrmicinae). Am. J. Agric. Biol. Sci. 1(4), 58–65.

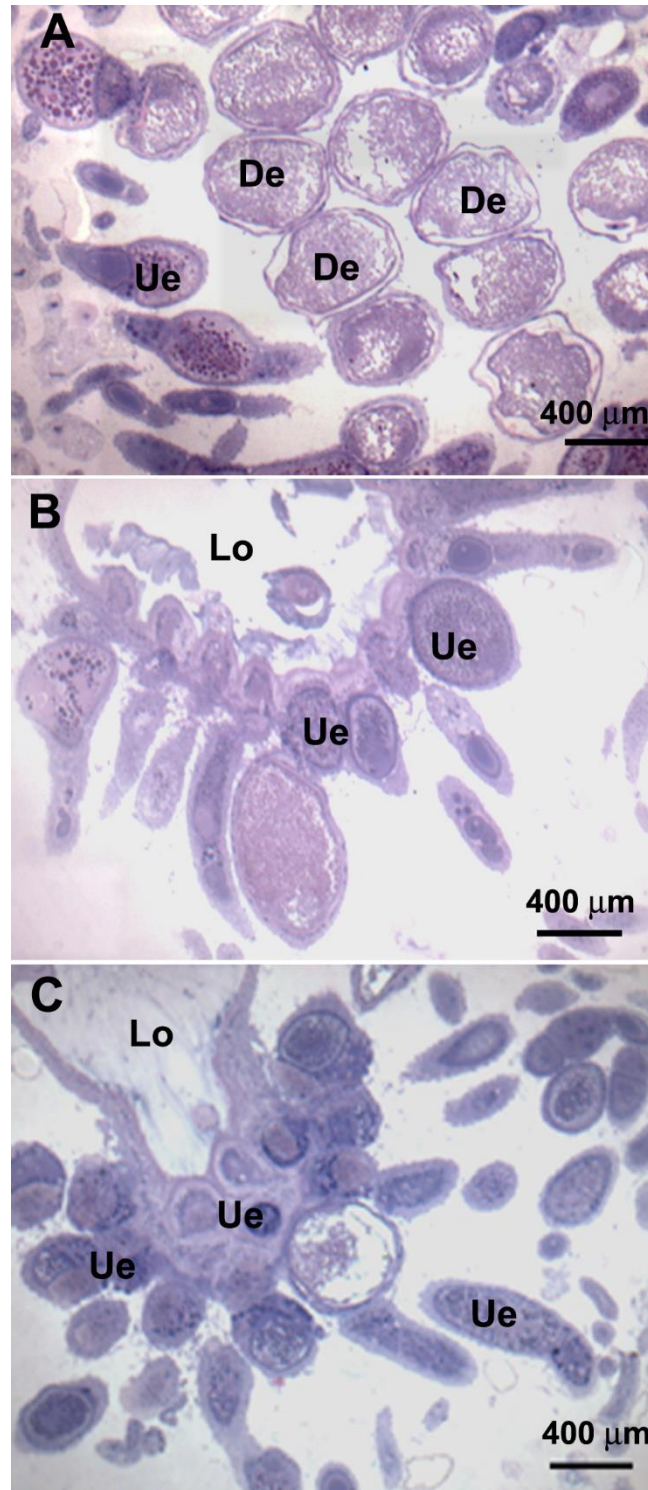
- Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 217–251.
- Reed, E., Majumdar, S.K., 1998. Differential cytotoxic effects of azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and mouse cultured cells. *Entomol. Exp. Appl.* 89, 215-221.
- Sayah, F., Fayet, C., Idaomar, M., Karlinsky, A., 1996. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect: Dermaptera). *Tissue Cell* 28, 741–749.
- Su, T., Mulla, M.S., 1998. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 204–209.
- Su, T. and M. S. Mulla. 1999a. Oviposition bioassay responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* to neem products containing azadirachtin. *Entomol Exp Appl.* 91, 337-345.
- Su, T. and M. S. Mulla. 1999b. Effects of neem products on blood feeding, fecundity and survivorship of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Vector Ecol.* 24, 202-215.
- Tufail, M., Takeda, M., 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J. Insect Physiol.* 54, 1447-1458.
- Ventura, M.U., Ito, M., 2000. Antifeedant activity of *Melia azedarach* (L.) extracts to *Diabrotica speciosa* (Genn.) (Coleoptera: Chrysomelidae) beetles. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 43, 215–219.
- Wagenhoff, E., Blum, R., Delb, H., 2016. Sublethal effects of NeemAzal®-T/S on cockchafers, *Melolontha* spp. (Col., Scarabaeidae), with a special focus on application timing and beetles' recovery capabilities. *Phytoparasitica* 44, 125–138.
- Woodhead, A.P., Stay, B., Seidel, S.L., Khan, M.A., Tobe, S.S., 1989. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5997–6001.
- Zanuncio, J.C., Mourão, S.A., Martínez, L.C., Wilcken, C.F., Ramalho, F.S., Plata-Rueda, A., Serrão, J.E., 2016. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Sci. Rep.* 6, 30261.



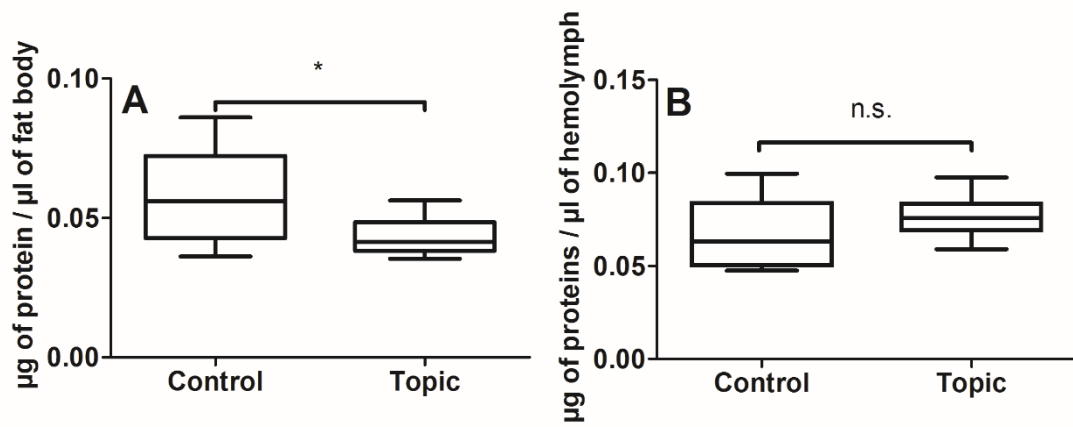
**Figure 1:** Number (mean  $\pm$  SD) of eggs laid by control *Atta sexdens* queens and queens exposed to 1.2 mg mL<sup>-1</sup> azadirachtin, topically or by ingestion, for 96 h. Different letters above columns indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments by Tukey's test. Error bars represent standard deviation.



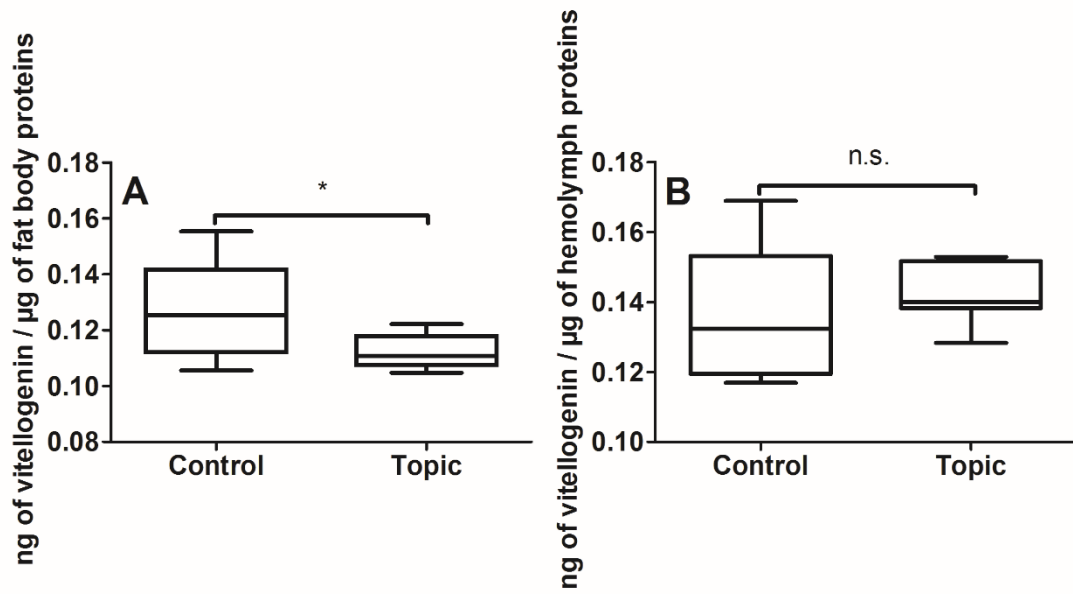
**Figure 2:** Cumulative oviposition curves during the life span of control *Atta sexdens* queens and queens exposed to  $1.2 \text{ mg mL}^{-1}$  azadirachtin, topically or by ingestion, drawn by the Kaplan–Meier method ( $\chi^2 = 213.8$ ;  $P < 0.0001$ ).



**Figure 3:** Histological sections of *A. sexdens* ovaries. A) Control queen showed well-developed eggs (De) in the ovarioles. Most eggs were at the same stage of development. B) Queens treated with a diet containing 1.2 mg mL<sup>-1</sup> azadirachtin had more undeveloped eggs (Ue) than developed eggs (De) reaching the lateral oviduct (Lo). C) Queens exposed topically to 1.2 mg mL<sup>-1</sup> azadirachtin showed the same features as queens exposed to azadirachtin by ingestion: few developed eggs (De) and many undeveloped eggs (Ue) reaching the oviduct (Lo).



**Figure 4:** Total protein content in the fat body (A) and hemolymph (B) of *A. sexdens* queens treated topically with  $1.2 \text{ mg mL}^{-1}$  azadirachtin (Student's t-test,  $\alpha = 5\%$ ; \*: significant, n.s.: not significant).



**Figure 5:** Vitellogenin concentration in the fat body (A) and hemolymph (B) of *A. sexdens* queens treated topically with  $1.2 \text{ mg mL}^{-1}$  azadirachtin (Student's t-test,  $\alpha = 5\%$ ; \*: significant, n.s.: not significant).

**CAPÍTULO II –  
AÇÃO DA AZADIRACTINA CONTRA O FUNGO MUTUALÍSTICO DAS  
FORMIGAS-CORTADEIRAS**

## CAPÍTULO II

### RESUMO

As formigas-cortadeiras vivem uma relação benéfica e obrigatória com o fungo que cultivam. Esse mutualismo permitiu o grande sucesso evolutivo dessas formigas, que são as mais derivadas em Attini. A grande capacidade de desfolha desses insetos, que muitas vezes ultrapassa o nível de dano econômico tolerável, as inclui como pragas severas em muitas culturas. A maioria dos métodos de controle visam atingir as formigas e poucos são aqueles voltados para o fungo. Porém, diante da estreita relação desses dois agentes do mutualismo, é de se esperar que um impacto no fungo reflita diretamente nas operárias e no desempenho da colônia como um todo. Diante disso, avaliou-se com este trabalho o efeito da azadiractina no desenvolvimento de *Leucoagaricus gongylophorus*, bem como seu efeito na composição de macronutrientes desse fungo cultivado pelas cortadeiras. A substância reduziu a massa final de fungo ao final do tratamento em todas as concentrações testadas, porém não reduziu a área final de crescimento. Observou-se também, uma redução na quantidade de hifas produzidas com o aumento da concentração de azadiractina. Em relação aos macronutrientes o composto não interferiu na composição de carboidratos, proteínas e gorduras totais, bem como não interferiu no teor de umidade do fungo. Dessa forma, observa-se que a azadiractina não alterou a composição de macronutrientes de *L. gongylophorus*, mas inibiu seu crescimento com a redução do número de hifas produzidas. Essa redução reflete diretamente na quantidade de nutrientes ofertados às operárias e à rainha. Esse efeito, em associação com outras consequências dessa substância em demais aspectos da colônia pode vir a otimizar o manejo desses insetos de grande importância econômica.

**Palavras-chave:** Attini. Fungicida. *Leucoagaricus gongylophorus*. Macronutrientes. Nim.

### ABSTRACT

Leaf-cutting ants have a beneficial and obligatory relationship with the fungus that they grow. This mutualism allowed the great evolutionary success of these ants, which are the most derived in Attini. The great defoliation capacity of these insects, which often exceeds the level of tolerable economic damage, includes them as severe pests in many cultures. Most control methods target ants, and few of them target the fungus. However, given the close relationship of these two agents of the mutualism, it is expected that an impact on the fungus will directly reflect on the workers and on the performance of the colony as a whole. Therefore, the effect of azadiractin on the development of *Leucoagaricus gongylophorus* was evaluated,

as well as its effect on the macronutrient composition of this fungus cultivated by the leaf-cutting ants. The substance reduced the final fungal mass at the end of treatment at all concentrations tested, but did not reduce the final growth area. A reduction in the amount of hyphae produced with increasing azadiractin concentration was also observed. Regarding macronutrients, the compound did not affect the total amount of carbohydrates, proteins and fats, as well as did not affect the moisture content of the fungus. Thus, it is observed that azadiractin did not alter the composition of *L. gongylophorus* macronutrients, but inhibited its growth by reducing the number of hyphae produced. This reduction reflects directly on the amount of nutrients offered to the workers and the queen. This effect, in combination with other consequences of this substance on other aspects of the colony may optimize the management of these insects of great economic importance.

**Keywords:** Attini. Fungicide. *Leucagaricus gongylophorus*. Macronutrients. Neem.

## 1 INTRODUÇÃO

A fungivoria, hábito pouco comum entre os animais, é encontrada em alguns grupos de formigas que, além de utilizarem os fungos como recurso alimentar, passaram a cultivá-los, uma forma de agricultura que teria surgido há cerca de 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Esse mutualismo tornou-se ainda mais complexo nas formigas-cortadeiras, que utilizam partes frescas das plantas como substrato para o crescimento do fungo (FOWLER, 1983).

As cortadeiras cultivam um basidiomiceto, *Leucoagaricus gongylophorus*, transmitido verticalmente entre as gerações, ou seja, as rainhas virgens carregam uma porção do fungo da colônia de origem para seu novo ninho (MIKHEYEV; MUELLER; ABBOT, 2010). O fungo possui diversas enzimas que degradam os polissacarídeos foliares e os transformam em carboidratos solúveis, que garantem a nutrição das formigas (PAGNOCCA, RODRIGUES, BACCI, 2011).

O fato de causarem danos econômicos significativos em muitas culturas por cortarem partes frescas das plantas como substrato para o fungo mutualístico faz com que as formigas-cortadeiras sejam pragas severas, devido à sua grande capacidade de desfolha. As principais estratégias de controle desses insetos consistem no uso de químicos que objetivam a mortalidade das formigas (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Porém, diante dessa complexa relação de mutualismo, ainda são poucos os estudos que investigam a ação de compostos no fungo e seu potencial na utilização como método de controle das formigas.

Dentre os metabólitos secundários produzidos por plantas, diversos são aqueles que possuem ação fungicida. A grande maioria desses compostos pertence ao grupo dos compostos fenólicos, seguidos pelos terpenóides e alcaloides (BOULOGNE et al., 2012).

Unir a ação inseticida a uma possível ação fungicida de um composto no controle das formigas-cortadeiras configuraria uma grande estratégia contra essas formigas, uma vez que ambos os agentes do mutualismo seriam atingidos, garantindo, assim, um colapso mais rápido da colônia.

Nesse sentido, nós objetivamos com este trabalho avaliar o efeito da azadiractina, um tetranortriterpenóide extraído do Nim (*Azadirachta indica*), no crescimento do fungo *L. gongylophorus*, uma vez que esse composto pertence a esse grupo amplamente citado com ação fungicida, bem como por possuir ação inseticida comprovada em diversos insetos (CHAUDHARY, 2017). A azadiractina apresenta como principais mecanismos de ação a

deterrença alimentar, a regulação do crescimento e a inibição da reprodução em diversos grupos de insetos (MORDUE et al., 1998).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Manutenção das colônias**

Os isolados dos fungos foram obtidos de colônias de *Atta sexdens* coletadas no município de Viçosa-MG. As colônias foram mantidas no Laboratório de formigas-cortadeiras (Insetário/DDE), na Universidade Federal de Viçosa, em condições controladas de temperatura ( $25\pm 5$  °C), umidade relativa do ar de  $75\pm 5$  % e fotoperíodo 12:12 (L:E), e alimentadas com folhas de *Acalypha wilkesiana* Müll. Arg., trocadas diariamente, além de um suprimento de água (DELLA LUCIA; MOREIRA, 1993).

### **2.2 Obtenção dos isolados do fungo**

Para obtenção dos isolados de *Leucoagaricus gongylophorus*, coletou-se fragmentos do jardim de fungo em sua porção mais superficial, região mais nova e local onde o material vegetal é depositado pelas formigas. Esses fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura sólido composto por glicose, cloreto de sódio, extrato de malte, peptona, aveia em flocos, ágar, água destilada e antibiótico clorafenicol, autoclavado a 120°C e 1,1 atm (PAGNOCCA, 1990). As placas foram mantidas em BOD a  $25\pm 2$ °C. Após o crescimento do micélio, o fungo foi transferido para novas placas contendo meio de cultura novo, procedimento repetido por três vezes, até a obtenção da cultura isolada.

Com o objetivo de se confirmar o isolamento da espécie *L. gongylophorus*, após o crescimento das culturas observou-se as hifas do fungo em microscópio de luz a fim de se verificar a presença dos gongilídios, extremidades arredondadas das hifas, que são estruturas características dessa espécie fúngica (DO NASCIMENTO et al., 2017). Os gongilídios podem ser observados na imagem obtida das hifas do fungo (Figura 1).

### **2.3 Pesticida**

Em todos os ensaios deste trabalho o produto utilizado foi o AZAMAX, fabricado pela E.I.D. Parry Limited (234, NSC Bose Road, Chennai, Índia), cuja titular do registro e importadora do formulado no Brasil é a DVA Especialidades – Comércio, Import., Exportação de Insumos Agropecuários Ltda (CNPJ: 09.361.259/0001-32 Endereço: Dr. Paulo Castro Pupo Nogueira, 90 – Piso Térreo, Sala G – Nova Campinas CEP: 13092 – Campinas / SP). O ingrediente ativo (azadiractina) está presente na concentração de 12g/L.

#### **2.4 Efeito no desenvolvimento do fungo**

A toxicidade da azadiractina ao fungo mutualístico das formigas-cortadeiras foi avaliada adicionando-se ao meio de cultura diferentes concentrações da substância. Essas concentrações foram determinadas de acordo com ensaios de toxicidade realizados nas operárias de formigas-cortadeiras, nas quais se testaram as concentrações de 0,6mg/mL, 1,2mg/mL, 3,0mg/mL e 6,0mg/mL (AMARAL et al., 2019).

Para cada concentração foram utilizadas dez placas de Petri (60cm de diâmetro) contendo 10mL de meio de cultura, o mesmo utilizado para o isolamento do fungo (item 2.3), ao qual foi adicionado o antibiótico rifampicina. A cada placa adicionou-se 100µL da solução de cada uma das concentrações, diluída em água. Ao grupo controle adicionou-se apenas 100µL de água. Em seguida, foi depositado sobre o meio um fragmento circular do isolado do fungo de 1cm de diâmetro.

As placas contendo o fungo foram mantidas em BOD ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante um mês para avaliação do crescimento. Após esse período, as placas foram fotografadas e através das imagens obtidas foi possível calcular a área de crescimento do fungo no programa Image J, com as devidas correções de escala.

O micélio do fungo foi removido do meio de cultura e seco em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  por três dias. Em seguida quantificou-se a massa seca do fungo até a obtenção de um valor constante.

#### **2.5 Quantificação dos macronutrientes e teor de umidade do fungo**

Os ensaios de quantificação dos macronutrientes presentes no fungo *Leucoagaricus gongylophorus* foram realizados no Laboratório de Análises de Produtos Alimentícios (LAPA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Os protocolos utilizados seguiram as metodologias presentes em Métodos de análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IV Edição) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Para todas as análises utilizou-se fungo coletado após um mês de crescimento em meio de cultura nas diferentes concentrações de azadiractina, da forma descrita no item 2.3 deste trabalho. Todos os testes foram feitos em triplicata.

### 2.5.1 Quantificação de carboidratos totais

Para a quantificação do teor de carboidrato da amostra coletou-se 2g de fungo do meio de cultura provenientes de cada concentração de azadiractina. A amostra foi transferida para um frasco Erlenmeyer ao qual adicionou-se 5mL de ácido clorídrico e transferida para uma chapa de aquecimento, onde permaneceu em ebulição por 3 horas. Após o resfriamento da solução, esta foi neutralizada com hidróxido de sódio a 40% com auxílio de papel indicador e transferida para um balão volumétrico de 250mL. Completou-se o volume com água e a amostra foi agitada e, em seguida, filtrada. O filtrado foi transferido para uma bureta de 25mL. A um balão de 250mL adicionou-se 10mL das soluções de Fehling A e B, juntamente com 40mL de água. O líquido foi aquecido até a ebulição. Adicionou-se, às gotas, a solução da bureta sob a solução do balão em ebulição, até que solução passasse da cor azul a incolor.

Para o cálculo dos carboidratos totais utilizou-se a seguinte equação:

$$\frac{100 \cdot A \cdot a}{P \cdot V} = \text{carboidratos totais (porcentagem m/m)}$$

Onde:

$A$  = mL da solução de P g da amostra

$a$  = g de carboidratos correspondente a 10 mL das soluções de Fehling

$P$  = massa da amostra em g

$V$  = mL da solução da amostra gasto na titulação

### 2.5.2 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais presentes no fungo, coletou-se 1g de fungo de cada uma das concentrações de azadiractina. Adicionou-se 25mL de ácido sulfúrico e cerca de 6g de uma mistura catalítica (dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). A amostra foi aquecida até que a solução adquiriu coloração azul-esverdeada e então aquecida por mais uma hora. Após o esfriamento a amostra foi destilada até obtenção de um volume de cerca de 250-300 mL do destilado. O excesso de

ácido sulfúrico 0,05M foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1M, usando vermelho de metila.

Para o cálculo das proteínas totais utilizou-se a equação abaixo:

$$\frac{V \cdot 0,14 \cdot f}{P} = \text{proteínas totais (porcentagem m/m)}$$

Em que:

V = diferença entre o volume (mL) de ácido sulfúrico 0,05 M e o volume de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação

P = g da amostra

f = fator de conversão (6,25) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008)

### 2.5.3 Quantificação do teor de umidade

A água é o principal constituinte do micélio dos fungos, e, portanto, o teor de umidade foi calculado para se obter a porcentagem correta de todos os constituintes em relação à massa total.

Utilizou-se 2g de fungo de cada umas das concentrações de azadiractina testadas. As amostras foram aquecidas por três horas e resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente. Em seguida, foram pesadas e a operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até a obtenção do peso constante.

Para o cálculo da umidade total da amostra utilizou-se a seguinte equação:

$$\frac{100 \cdot N}{P} = \text{umidade total a } 105^{\circ} \text{ (porcentagem m/m)}$$

Em que:

N = g de umidade (perda de massa em g)

P = g da amostra

### 2.5.4 Estimativa do teor de gorduras

Por se tratar de uma amostra com baixo teor de gordura, estimou-se os valores de gordura totais excluindo-se os demais parâmetros quantificados da massa total da amostra avaliada.

## 2.6 Análises estatísticas

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram verificados usando qq-Norm e Residuals vs. Fitted, respectivamente. A relação entre a massa (g) e área (cm<sup>2</sup>) e as concentrações de azadiractina foi testada usando análise de regressão com procedimento de ajuste de curva, onde a seleção do modelo foi baseada na parcimônia, onde altos valores de F e R<sup>2</sup> implicam em modelo com maior complexidade. Todas as análises foram conduzidas no software R (versão 3.5.1) usando os pacotes stat e mass (R CORE TEAM, 2019).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Efeito no desenvolvimento do fungo

A azadiractina inibiu o crescimento do fungo *L. gongylophorus* como mostrado pela redução da massa seca de fungo, após um mês de tratamento, em todas as concentrações testadas em relação ao controle ( $F_{1,37}= 16,7$ ;  $R^2= 0,017$ ;  $P<0,001$ ) (Figura 2). Além disso, não houve diferença significativa entre as concentrações (Tabela 1).

Em relação à área de crescimento do fungo após um mês de tratamento, não houve diferença significativa entre controle e as concentrações de azadiractina ( $F_{1,48}=0,82$ ;  $R^2=0,017$ ;  $P=0,36$ ) (Tabela 1, Figura 3).

**Tabela 1:** Média da massa seca ( $\pm$  desvio padrão) e área ( $\pm$  desvio padrão) de crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* após um mês na presença de diferentes concentrações de azadiractina. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem pelo teste F a 5% de significância.

Concentração	Massa seca (g)	Área (cm <sup>2</sup> )
0,0 mg/MI	0,131 $\pm$ 0,045 a	13,107 $\pm$ 7,291 a
0,6 mg/MI	0,054 $\pm$ 0,010 b	11,243 $\pm$ 2,210 a
1,2 mg/mL	0,039 $\pm$ 0,018 b	15,316 $\pm$ 7,016 a
3,0 mg/MI	0,039 $\pm$ 0,018 b	14,841 $\pm$ 7,815 a
6,0 mg/MI	0,032 $\pm$ 0,025 b	14,745 $\pm$ 1,530 a

### 3.2 Composição dos macronutrientes e teor de umidade

Em relação à composição de macronutrientes não houve diferença entre o controle e as diferentes concentrações de azadiractina em relação à quantidade de carboidratos totais (Tabela

2) e proteínas totais (Tabela 3). O teor de umidade das amostras também não apresentou diferenças entre o controle e as diferentes concentrações de azadiractina, conforme observa-se na Tabela 4. A estimativa do teor de gorduras também não apresentou diferenças entre controle e tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 2:** Percentual do teor de carboidratos do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* isolado em meio de cultura específico, após o tratamento com diferentes concentrações de azadiractina. Média da porcentagem do teor de carboidratos  $\pm$  erro padrão.

Concentração	Teor de carboidratos (g)/ 100g de fungo
0,0 mg/mL	5 $\pm$ 1
0,6 mg/mL	5 $\pm$ 1
1,2 mg/mL	5 $\pm$ 1
3,0 mg/mL	5 $\pm$ 3
6,0 mg/mL	5 $\pm$ 1

**Tabela 3:** Percentual do teor de proteínas do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* isolado em meio de cultura específico, após o tratamento com diferentes concentrações de azadiractina. Média do percentual do teor de proteínas totais.

Concentração	Teor de proteínas (g)/ 100g de fungo
0,0 mg/mL	2
0,6 mg/mL	2
1,2 mg/mL	2
3,0 mg/mL	2
6,0 mg/mL	2

**Tabela 4:** Percentual do teor de umidade do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* isolado em meio de cultura específico, após o tratamento com diferentes concentrações de azadiractina. Média do percentual do teor de umidade  $\pm$  erro padrão.

Concentração	Teor de umidade (g)/ 100g de fungo
0,0 mg/mL	91 $\pm$ 1
0,6 mg/mL	92 $\pm$ 1
1,2 mg/mL	91 $\pm$ 1
3,0 mg/mL	92 $\pm$ 1
6,0 mg/mL	91 $\pm$ 1

**Tabela 5:** Estimativa do percentual do teor de gordura do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* isolado em meio de cultura específico, após o tratamento com diferentes concentrações de azadiractina. Média do percentual do teor de gordura estimada pela diferença da massa total e dos demais parâmetros (carboidratos totais, proteínas totais e umidade total).

Concentração	Teor de gordura (g)/ 100g de fungo
0,0 mg/mL	< 1g
0,6 mg/mL	< 1g
1,2 mg/mL	< 1g
3,0 mg/mL	< 1g
6,0 mg/mL	< 1g

Além disso, é possível observar através das imagens obtidas ao final do experimento que, apesar de não existir diferença entre a área de crescimento do fungo das concentrações testadas e o controle, a quantidade de hifas diminui visivelmente com o aumento da concentração da substância, o que reforça a redução dos valores de massa encontrados ao fim do teste nos grupos sob efeito da azadiractina (Figura 4). É possível notar que a quantidade de hifas e gongilídios presentes nos grupos tratados é menor do que aquelas do controle (Figura 5).

#### 4 DISCUSSÃO

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* apresentou menor massa após o crescimento em meio de cultura contendo azadiractina, mesmo em baixas concentrações. Por outro lado, a substância não interferiu na área total de crescimento do fungo. Esses resultados indicam que a azadiractina inibiu o desenvolvimento gravimétrico do fungo cultivado pelas formigas-cortadeiras apesar de não interferir no seu crescimento radial em área.

As operárias de formigas-cortadeiras alimentam-se dos nutrientes líquidos presentes nos gongilídios, que são ricos em carboidratos, com os quais também alimentam as rainhas (MUELLER et al., 2001). As larvas possuem enzimas capazes de digerir a parede celular das hifas e, portanto, também utilizam essa estrutura como fonte adicional de aquisição de nutrientes (MOREIRA et al., 2011).

A redução da massa final do fungo, ao que tudo indica, é resultado da redução na produção de hifas, visto que ao fim do experimento é visível uma menor quantidade das mesmas com o aumento da concentração de azadiractina. Esse efeito traz implicações diretas para a

colônia, uma vez que a redução do número de hifas afetaria, conseqüentemente, a disponibilidade de nutrientes para a rainha e as operárias, com exceção das forrageadoras que também se alimentam dos exsudatos das plantas durante o corte (FORTI; ANDRADE, 1999). A espécie fúngica *Penicillium expansum* apresentou uma resposta semelhante à observada para *L. gongylophorus* sob ação da azadiractina. A substância não inibiu o crescimento radial do fungo, porém alterou a aparência da colônia com a diminuição de sua profundidade e inibição da produção de exsudatos (MOSSINI; DE OLIVEIRA; KEMMELMEIER, 2004).

Por outro lado, a composição de macronutrientes do fungo não foi alterada na presença da substância, o que indica que a azadiractina não interferiu na capacidade do fungo de explorar os nutrientes de seu substrato e, dessa forma, apesar da disponibilidade do fungo diminuir com a redução das hifas, a qualidade nutricional das mesmas não foi alterada.

É importante ressaltar que a degradação e digestão dos conteúdos vegetais trazidos para os ninhos de formigas-cortadeiras são resultado de uma ação conjunta do fungo e das formigas, o que está intimamente relacionado com o mutualismo desses organismos (DEMILTO et al., 2017; MUELLER et al., 2005). O jardim produz suas enzimas na sua porção central onde a atividade é ótima, porém, as folhas são depositadas pelas formigas na região mais superficial (MOLLER et al., 2011). A digestão do material vegetal é possibilitada pela ingestão dessas enzimas pelas formigas, que as depositam com as fezes juntamente com as folhas. As enzimas não são metabolizadas no intestino da formiga e passam para as fezes intactas (DEMILTO et al., 2017; RØNHEDE; BOOMSMA; ROSENDAHL, 2004). Já se observou que todas as enzimas pectinolíticas presentes nas fezes das operárias são provenientes do jardim de fungo, e todas elas estavam presentes nos gongilídios (SCHIØTT et al., 2010). A ação das formigas na distribuição das enzimas certamente otimiza o acesso das hifas do fungo às proteínas e carboidratos presentes nas folhas (DE FINE LICHT et al., 2013).

Estudo recente demonstrou que a azadiractina provoca aumento da mortalidade das operárias de formigas-cortadeiras (AMARAL et al., 2019). Como a atividade ótima do fungo depende diretamente da ação das formigas e a azadiractina provoca uma redução na produção de hifas pelo fungo, a união desses dois aspectos sugere uma estratégia no manejo desses insetos.

## 5 CONCLUSÕES

A azadiractina inibiu o crescimento do fungo cultivado pelas formigas-cortadeiras com a redução da quantidade de hifas produzidas, mas sem interferir na sua qualidade nutricional. A diminuição das hifas produzidas reflete diretamente na quantidade de nutrientes fornecidos

às formigas, o que pode configurar uma estratégia de manejo desses insetos que, aliada a outras ações deletérias da azadiractina, pode facilitar o controle dessas pragas de importância econômica.

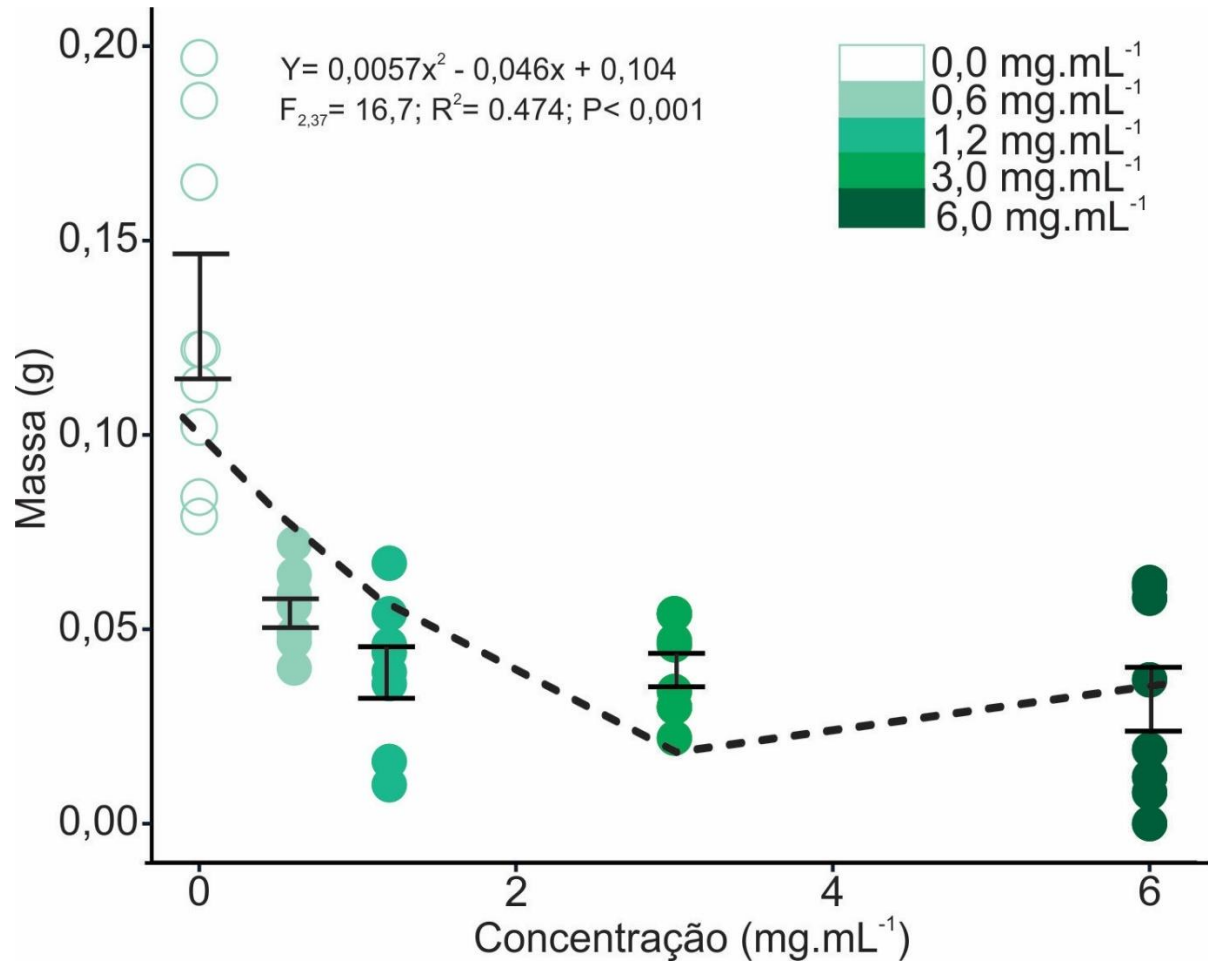
## REFERÊNCIAS

- AMARAL, K. D. et al. Effect of azadirachtin on mortality and immune response of leaf-cutting ants. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 10, p. 1190–1197, 2019.
- BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325–347, 2012.
- CHAUDHARY, S. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2017.
- DE FINE LICHT, H. H. et al. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 2, p. 583–587, 2013.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O. Caracterização de ninhos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG, Brazil: Folha de Viçosa, 1993. p. 32–42.
- DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.
- DEMILTO, A. M. et al. Effects of substrate, ant and fungal species on plant fiber degradation in a fungus-gardening ant symbiosis. **Journal of Insect Physiology**, v. 98, p. 301–308, 2017.
- DO NASCIMENTO, M. O. et al. Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 699–704, 2017.
- FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. **Naturalia**, 1999.
- FOWLER, H.G. Latitudinal gradients and diversity of the leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v.31, p.213-216, 1983.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020
- MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Comparative dating of Attine ant and Lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. **The American Naturalist**, v. 175, n. 6, p. E126–E133, 2010.
- MOLLER, I. E. et al. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. **PLoS ONE**, v. 6(3): e17506, 2011.
- MORDUE, A. J. et al. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science**, v. 54, n. 3, p. 277–284, 1998.
- MOREIRA, D.D.O.; ERTHAL, M.; SAMUELS, R.I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 204–225.

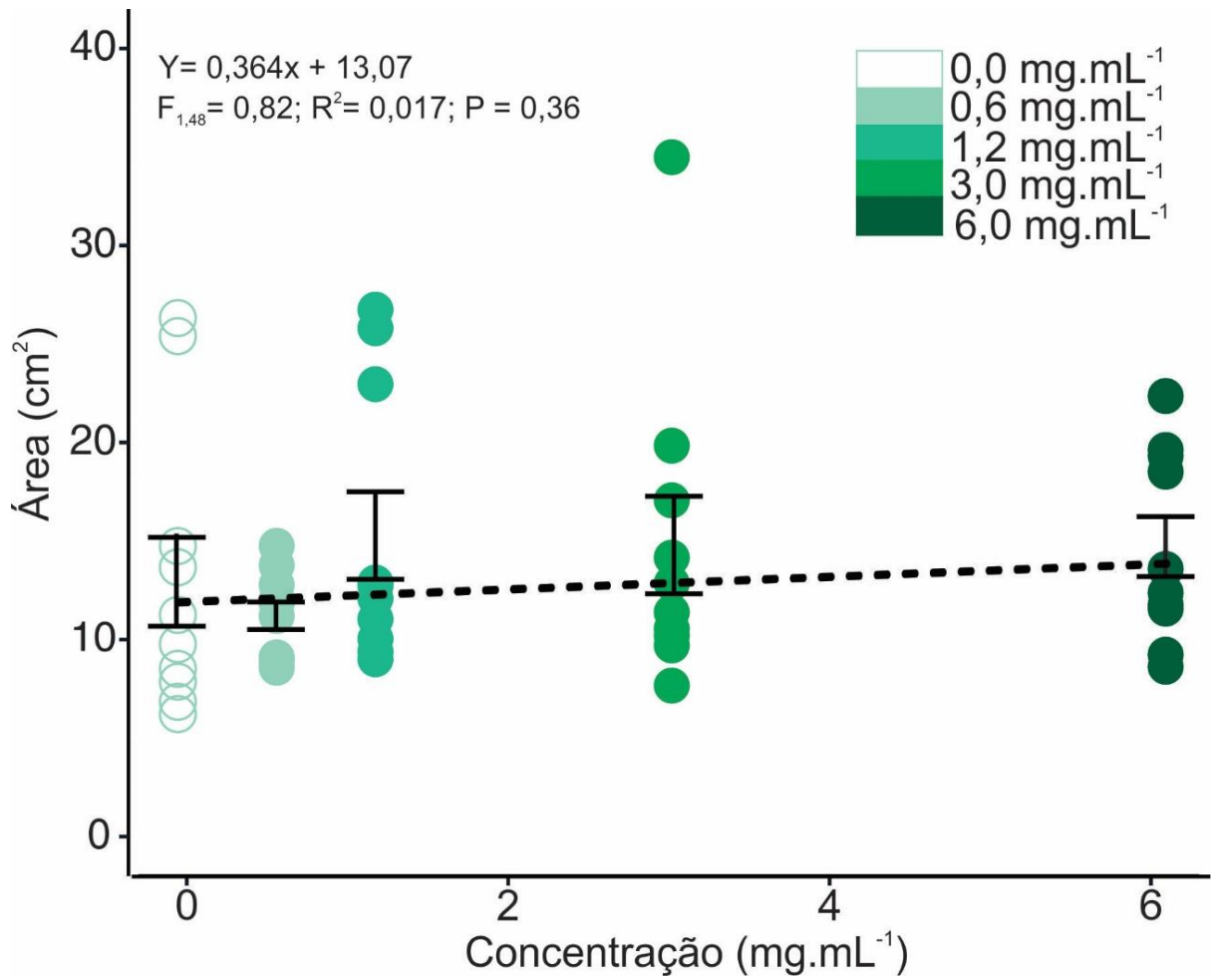
- MOSSINI, S. A. G.; DE OLIVEIRA, K. P.; KEMMELMEIER, C. Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. **Journal of Basic Microbiology**, 2004.
- MÜELLER, U. G. et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, v.76, p. 169-197, 2001.
- MÜELLER, U. G. et al. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p.563-595, 2005.
- PAGNOCCA, F.C; RODRIGUES, A., BACCI, M.J. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras:da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 262–283.
- 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.
- R CORE TEAM. 2019. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for 721 Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RØNHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**, v. 108, p. 101-106, 2004.
- SCHIØTT, M. et al. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC Biology**, v.8, p. 156, 2010.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.



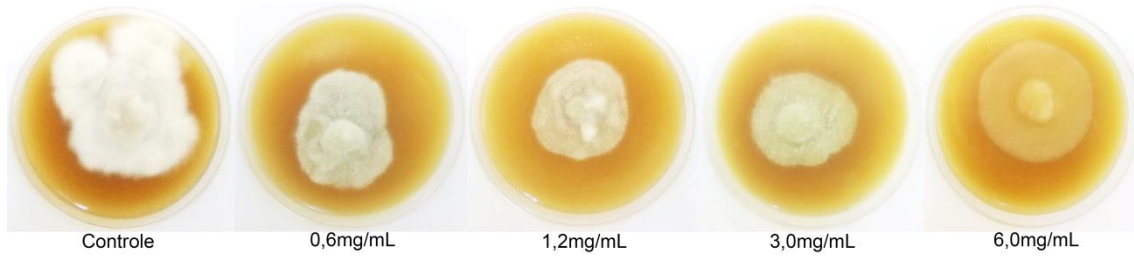
**Figura 1:** *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura. A seta aponta um gongilídio na extremidade de uma hifa. Imagem obtida em estereomicroscópio.



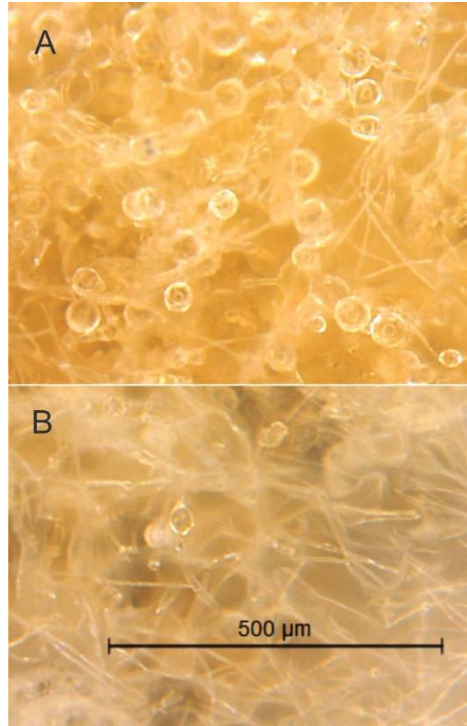
**Figura 2:** Massa final de crescimento de *L. gongylophorus* na presença de diferentes concentrações de azadiractina, após um mês de tratamento. Barras indicam o erro padrão da média.



**Figura 3:** Área final de crescimento de *L. gongylophorus* na presença de diferentes concentrações de azadiractina, após um mês de tratamento. Barras indicam o erro padrão da média.



**Figura 4:** Desenvolvimento do micélio do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* ao final de um mês de tratamento com as diferentes concentrações de azadiractina. Observa-se que a quantidade de hifas reduz com o aumento da concentração da substância. A região central mais desenvolvida em todos os grupos corresponde ao fragmento circular inicial depositado sobre o meio de cultura.



**Figura 5:** Comparação da quantidade de hifas de *L. gongylophorus* ao final de um mês de tratamento. (A) Controle e (B) Tratamento na concentração de 0,6mg/mL. Observa-se que no controle há maior número de hifas e gongilídios, enquanto no tratamento a hifas estão menos concentradas e apresentam menos gongilídios.

**CAPÍTULO III –  
AÇÃO DA ISCA GRANULADA DE AZADIRACTINA NAS COLÔNIAS DE  
FORMIGAS-CORTADEIRAS**

## CAPÍTULO III

### RESUMO

A isca granulada é um dos métodos mais simples e baratos para o controle das formigas-cortadeiras e, conseqüentemente, um dos mais utilizados. Porém, os produtos comercializados na atualidade possuem como ingrediente ativo substâncias químicas que durante o processamento são fontes de poluentes persistentes no ambiente. Em um contexto em que a redução do impacto ao ambiente e aos organismos não-alvo devem ser priorizados, surge a necessidade pela busca de novas moléculas para o controle desses insetos. A azadiractina é uma substância presente no Nim, *Azadirachta indica*, que tem ação inseticida amplamente avaliada em diversos insetos, porém, ainda é pouco explorada para o controle das cortadeiras. Objetivou-se, com este trabalho, desenvolver uma isca contendo azadiractina e avaliar seus efeitos no forrageamento e na remoção de lixo das colônias de formigas-cortadeiras. Logo após o oferecimento das iscas houve redução na massa foliar transportada para o ninho, bem como, da massa de lixo removida das colônias. A redução do forrageamento impacta diretamente a injúria provocada nas plantas, enquanto a redução da remoção de lixo indica que as formigas não detectaram a ação deletéria do composto, característica importante para uma isca. A ação do composto culminou com a morte de todas as colônias. Assim, a azadiractina, se apresenta como um potencial ingrediente ativo a ser usado no controle das formigas-cortadeiras.

**Palavras-chave:** Attini. Efeitos subletais. Formicidae. Isca formicida. Nim.

### ABSTRACT

A granulated bait is one of the simplest and cheapest methods for the control of leaf-cutting ants and therefore one of the most widely used. However, the products currently available in the market have as active ingredient chemicals that during processing are sources of persistent pollutants in the environment. In a context where reducing the impact on the environment and non-target organisms must be prioritized, the search for new molecules to control these insects is necessary. Azadiractin, from the neem tree, *Azadirachta indica*, has insecticidal action widely evaluated in various insects, but is still little explored for the control of leaf-cutting ants. The objective of this work was to develop an azadiractin-based bait and to evaluate its effects on foraging activity and waste management of leafcutter ant colonies. After offering the baits, there was a reduction in the leaf mass transported to the nest, as well as in the mass of waste removed from the colonies. Reduction in foraging directly impacts plant

injury, while reduced litter removal indicates that ants did not detect the deleterious action of compost, an important feature for a bait. The compound's action culminated in the death of all colonies. Thus, azadiractin is a potential active ingredient to be used to control leaf-cutting ants.

**Keywords:** Attini. Formicidae. Formicide bait. Neem. Sublethal effects.

## 1 INTRODUÇÃO

As iscas granuladas são veículos muito eficientes de dispersão de compostos inseticidas em colônia de formigas-cortadeiras e configuram um dos métodos mais simples, baratos e eficientes no controle desses insetos, que são pragas severas em diversas culturas agrícolas e florestais (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Além disso, as iscas causam impacto menos significativos em organismos não alvo em relação a outros métodos de controle, pois são rapidamente transportadas para o interior do ninho e o ingrediente ativo é pouco dispersado no ambiente (BRITTO et al., 2016).

Para que uma isca tóxica seja eficaz no controle dessas formigas ela deve apresentar uma ação retardada, ser atrativa para as operárias, ter seu ingrediente ativo facilmente disperso dentro do ninho, além de ser degradada facilmente no ambiente e ter baixa toxicidade aos organismos não alvos (FORTI; NAGAMOTO; PRETTO, 1998; PEREGRINE; CHERRETT, 1974).

Quando uma isca é atrativa às formigas-cortadeiras e o composto tóxico não é detectado, ela é carregada rapidamente para o ninho pelas operárias forrageadoras. A contaminação dos membros da colônia ocorre devido ao processamento e incorporação desse material ao jardim de fungo. Todas as operárias que entram em contato com a isca durante seu processamento, hidratação e manipulação são contaminadas pelo princípio ativo (FORTI et al., 2007). Os principais comportamentos que promovem a dispersão de um inseticida são o *selfgrooming* (auto-higienização), o *allogrooming* (higienização entre indivíduos da colônia) e o contato direto entre as companheiras de ninho (DA SILVA CAMARGO; PUCCINI; FORTI, 2017). A eficácia da isca está condicionada à realização desses comportamentos (DE ANDRADE et al., 2002; FORTI; ANDRADE; RAMOS, 2000; NAGAMOTO et al., 2004).

A sulfluramida é o ingrediente ativo mais utilizado nas iscas comerciais e, apesar de sua eficiência, esse composto pode ser fonte do ácido perfluoro-octanossulfônico (PFOS), um poluente orgânico persistente, o que tem impulsionado a busca por compostos alternativos para o controle das cortadeiras (BRITTO et al., 2016).

A azadiractina, metabólito secundário produzido pelo Nim, *Azadirachta indica*, surge nesse contexto como um possível ingrediente ativo a ser utilizado no controle das cortadeiras. Essa substância ocasiona alguns efeitos negativos nessas formigas, como a redução da sobrevivência das operárias e da oviposição das rainhas, bem como reduz a viabilidade dos ovos produzidos por elas (AMARAL et al., 2018, 2019). Porém, a ação desse composto em outros aspectos das colônias desses insetos ainda necessita de maiores investigações.

Assim sendo, objetiva-se com este trabalho desenvolver uma isca contendo a azadiractina como princípio ativo e avaliar seus efeitos no comportamento de forrageamento e na capacidade de limpeza do ninho pelas operárias, bem como, a eficácia dessa isca na sobrevivência de colônias em condições de laboratório da espécie de formiga-cortadeira *Atta sexdens*, uma das mais importantes pragas em cultivos de eucalipto e amplamente distribuída no território brasileiro (DELABIE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Formulação da isca de azadiractina**

A isca artesanal foi confeccionada nas dimensões das iscas comerciais mais utilizadas, a semelhança do trabalho de Lima et al. (2003), contendo os seguintes ingredientes: farinha de trigo, óleo vegetal, suco artificial de laranja em pó, água e solução de azadiractina, na proporção em massa, de 7:1:2:3:3. A farinha de trigo, a água e o óleo vegetal foram utilizados para dar consistência ao grânulo da isca, permitindo o transporte pelas formigas, enquanto o suco artificial de laranja funcionou como atrativo. A isca continha o composto na concentração de 2,403 mg/mL, concentração letal média de 50% (CL50) para as operárias de formigas-cortadeiras (AMARAL et al., 2019).

Após a mistura de todos os ingredientes, os grânulos foram secos em estufa a 45° por 24h e cortados nas dimensões de 2 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento (Figura 1).

### **2.2 Manutenção das colônias**

Seis colônias de *A. sexdens* com aproximadamente três litros de jardim de fungo foram coletadas no município de Viçosa-MG, com aproximadamente dois anos de fundação e consumo foliar semelhante. As colônias foram mantidas no Laboratório de Formigas-cortadeiras (Insetário/DBA), na Universidade Federal de Viçosa, em condições controladas de temperatura (25±5 °C), umidade relativa de 75±5 % e fotoperíodo 12:12 (L:E), e alimentadas com folhas de *Acalypha wilkesiana* Müll. Arg., trocadas diariamente, além de um suprimento de água, de acordo com a metodologia de Della Lucia & Moreira (1993).

### **2.3 Ação da isca de azadiractina no forrageamento das operárias**

Diariamente, foram oferecidos 20g de folhas de *A. wilkesiana* a cada colônia. A massa consumida foi, então, quantificada durante 15 dias, excluindo os valores naturais de perda d'água. Em seguida, foram oferecidos 8g de isca contendo azadiractina por cinco dias para cada colônia. Utilizou-se essa quantidade de isca, pois para formigueiros semelhantes ao desse estudo recomenda-se o oferecimento de 40g de isca. Para que não houvesse uma exposição prolongada dos grânulos nas colônias, optou-se pelo oferecimento gradual, durante cinco dias, uma vez que não houve qualquer rejeição após o primeiro dia de oferecimento em ensaios preliminares.

Posteriormente seguiu-se com a mesma avaliação de consumo foliar, por mais 15 dias, a semelhança de Antunes & Della Lucia (1999).

#### **2.4 Ação da azadiractina na remoção de lixo pelas operárias**

Simultaneamente ao ensaio de avaliação do efeito da isca no comportamento de forrageamento (Item 2.3), avaliou-se a ação da azadiractina na remoção de lixo pelas operárias. Durante todos os dias, antes, durante e após o tratamento com a isca, quantificou-se a massa de lixo removido pelas colônias do interior do jardim de fungo.

A remoção de lixo foi avaliada porque as formigas-cortadeiras permanecem em constante avaliação do material que incorporam ao jardim de fungo e, quando detectam alguma ação deletéria, iniciam a limpeza e transporte desse substrato para as câmaras de lixo (ARENAS; ROCES, 2017). Além disso, a limpeza da colônia é uma atividade essencial, que reduz a dispersão de patógenos dentro do ninho, e qualquer ação que promova sua redução, impacta diretamente a sobrevivência de seus membros.

#### **2.5 Observação da eficácia da isca nas colônias**

Após o período de análise do consumo foliar e da taxa de remoção de lixo, as colônias foram observadas diariamente em relação aos efeitos do tratamento no que diz respeito ao volume do jardim de fungo e sobrevivência das colônias. Considerou-se morte da colônia o dia da morte de sua rainha. Ressalta-se que algumas colônias permanecem com alguns indivíduos viáveis mesmo após a morte da rainha; porém, por ser esta o único indivíduo reprodutivo, após sua morte, considera-se morta a colônia (DELLA LUCIA et al., 2003).

#### **2.6 Análises estatísticas**

O contraste entre consumo foliar e lixo produzido entre o pré e pós tratamento foi realizado através test-t pareado ( $P = 0.05$ ). Os dados referentes à remoção do lixo antes, durante e após o tratamento foram submetidos à análise de variância e comparados por contrastes ( $P = 0.05$ ). Todas as análises foram conduzidas no software R (versão 3.5.1) usando os pacotes stat e mass (R Core Team, 2019).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Ação da azadiractina nas atividades de forrageamento e descarte de lixo**

Em todas as colônias houve carregamento e incorporação da isca ao jardim de fungo durante todos os dias de tratamento (Figura 2).

A comparação do consumo foliar das colônias de formigas-cortadeiras antes e após o oferecimento da isca contendo azadiractina evidenciou uma redução significativa na massa foliar consumida pelas colônias após o tratamento; entretanto não houve diferença no consumo foliar entre os dias após o tratamento ( $t=4,845$ ; GL: 83;  $p < 0,001$ ) (Figura 3; Tabela 1).

Após o oferecimento da isca, houve redução significativa na quantidade de lixo removida da colônia, em comparação ao período anterior ao tratamento ( $t= 2,54$ ; GL: 83;  $p=0,01$ ) (Figura 4). A remoção de lixo durante o período de tratamento não diferiu daquela anterior ao oferecimento da isca, porém, foi significativamente maior do que no período pós-tratamento ( $F_{2,87}=4,77$   $p=0,01$ ) (Figura 4).

#### **3.2 Eficácia da isca de azadiractina nas colônias**

Após, aproximadamente, cinco meses do oferecimento das iscas, 100% das colônias morreram. Alguns eventos foram comuns a todas, como a mortalidade das operárias, redução drástica do jardim de fungo e a morte da rainha (Figura 5). A redução do jardim de fungo iniciou-se logo nas duas primeiras semanas em todas as colônias, com um tempo médio de dez dias. Porém, houve grande variação no tempo decorrido para a morte da rainha e consequentemente da colônia entre os ninhos avaliados, com uma média de 75 dias para a morte, sendo o tempo mínimo de 22 dias e o máximo de 135. A Tabela 2 traz um resumo dos eventos ocorridos em cada colônia após o tratamento.

Em algumas colônias houve completa mortalidade dos indivíduos adultos e do jardim de fungo e a rainha foi o último indivíduo a morrer. Em outras, porém, as rainhas morreram

antes de suas operárias e algumas operárias permaneceram vivas por algum tempo, em média, dez dias.

**Tabela 1:** Consumo foliar (g) de colônias de *Atta sexdens* nos dias antes e após o tratamento com as iscas contendo azadiractina. Média  $\pm$  erro padrão.

<b>Dia</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Pós-tratamento</b>
<b>1</b>	13,84 $\pm$ 0,325	11,52 $\pm$ 0,687
<b>2</b>	14,19 $\pm$ 0,457	11,24 $\pm$ 0,755
<b>3</b>	14,46 $\pm$ 0,349	11,12 $\pm$ 0,543
<b>4</b>	13,12 $\pm$ 0,287	11,06 $\pm$ 0,632
<b>5</b>	14,74 $\pm$ 0,403	10,95 $\pm$ 0,667
<b>6</b>	13,98 $\pm$ 0,366	11,93 $\pm$ 0,544
<b>7</b>	14,95 $\pm$ 0,321	11,91 $\pm$ 0,489
<b>8</b>	14,72 $\pm$ 0,455	11,61 $\pm$ 0,689
<b>9</b>	15,29 $\pm$ 0,478	12,34 $\pm$ 0,581
<b>10</b>	13,07 $\pm$ 0,324	10,59 $\pm$ 0,673
<b>11</b>	13,97 $\pm$ 0,322	11,47 $\pm$ 0,577
<b>12</b>	13,43 $\pm$ 0,456	10,33 $\pm$ 0,695
<b>13</b>	14,34 $\pm$ 0,238	11,79 $\pm$ 0,677
<b>14</b>	13,73 $\pm$ 0,393	10,32 $\pm$ 0,531
<b>15</b>	14,96 $\pm$ 0,269	11,46 $\pm$ 0,692

**Tabela 2:** Tempo (dias) decorrido para o início da redução do jardim de fungo e para a morte da colônia após o oferecimento de isca contendo azadiractina.

	<b>Redução do jardim de fungo</b>	<b>Morte da rainha</b>
<b>Colônia 1</b>	11	135
<b>Colônia 2</b>	12	87
<b>Colônia 3</b>	14	113
<b>Colônia 4</b>	5	22
<b>Colônia 5</b>	9	52
<b>Colônia 6</b>	9	43

#### 4 DISCUSSÃO

As iscas contendo azadiractina provocaram uma redução no consumo foliar das colônias de formigas-cortadeiras. Ressalta-se também, a rapidez com que o efeito foi observado, logo após cinco dias de tratamento já se observou a redução do forrageamento. Outro ponto a ser considerado é a manutenção do efeito ao longo dos dias pós-tratamento, o que evidencia a permanência da ação da substância.

A azadiractina apresenta como um dos principais mecanismos de ação a deterrência alimentar, o que já foi observado em diversos grupos de insetos (MORGAN, 2009). Além disso, essa substância provoca efeitos antialimentares secundários que promovem distúrbios fisiológicos, como a dificuldade do transporte do alimento através do intestino médio e a inibição da produção das enzimas digestivas (CHAUDHARY, 2017; SCHMUTTERER, 1985).

Apesar de essa deterrência alimentar causada pela azadiractina ser um efeito evidente em diversos insetos, as bases fisiológicas desse comportamento ainda estão pouco esclarecidas, e acredita-se que promovam a redução na sobrevivência dos insetos por privarem os mesmos da ingestão de nutrientes (CHAUDHARY, 2017). Porém, ressalta-se a relevância desse modo de ação, uma vez que a paralisação da alimentação dos insetos-praga reduz diretamente o dano que eles causam nas diversas culturas, como já foi observado em espécies de lagartas do gênero *Spodoptera* (MORDUE et al., 1998) al., 1998). O fato da isca de azadiractina reduzir o forrageamento das cortadeiras implica diretamente na redução da desfolha das plantas, favorecendo o manejo dessas formigas.

A isca contendo azadiractina também reduziu o montante de lixo removido pelas operárias. As formigas-cortadeiras permanecem em constante avaliação do substrato que incorporam ao jardim de fungo e podem remover de dentro da colônia um substrato contaminante após algum tempo do seu transporte (SAVERSCHEK et al., 2010). Esse comportamento ocorre quando o composto tóxico age nas formigas ou quando sua ação promove alterações no fungo, que são detectadas pelas operárias tardiamente (KNAPP; HOWSE; KERMARREC, 1990). Além disso, assim que as formigas percebem que algumas porções do fungo foram danificadas, elas iniciam sua limpeza e transportam esses fragmentos para as câmaras de lixo. Esse material descartado contém pistas que auxiliam no reconhecimento da planta pelas operárias, que associam esses estímulos aos danos causados ao fungo (ARENAS; ROCES, 2017).

A eficiente seleção e avaliação durante a aquisição dos recursos dificulta o desenvolvimento de novas táticas de controle desses insetos, que são muito especializados em detectar substâncias danosas. No caso da azadiractina, o fato de ter ocorrido uma redução na

remoção de lixo pelas operárias, o que pode ser uma consequência da diminuição do consumo foliar, evidencia, também, que as operárias não detectaram a ação nociva da substância dentro da colônia ao não removerem as iscas do ninho, uma boa característica para uma substância que se pretende utilizar para o controle de insetos sociais.

Após cerca de quatro meses e meio do oferecimento das iscas às colônias, todas elas morreram. Ressalta-se que, mesmo concentrações subletais podem ter um impacto significativo em diversos aspectos fisiológicos e comportamentais de uma colônia (LEE, 2000). Em insetos eussociais, como as formigas-cortadeiras esses efeitos subletais podem acelerar o colapso da colônia, pois os indivíduos são interdependentes e funcionam como um “superorganismo” e, assim, o impacto nas funções ou sobrevivência de membros de determinada casta da colônia traz consequências para os demais companheiros de ninho (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

A primeira implicação da ação das iscas foi a redução do jardim de fungo, o que pode ser consequência da redução da taxa de consumo foliar das colônias. Por outro lado, observa-se grande variação nos tempos de morte das colônias. É importante ressaltar, que mesmo em ninhos de mesmo tamanho existem variações individuais em relação ao número de indivíduos, proporção de indivíduos por casta, bem como o *fitness* de cada colônia, o que podem influenciar diretamente a maneira como elas sofrem a ação do tratamento (JANDT et al., 2014). Além disso, considera-se o fim da colônia com a morte da rainha, pois diversas atividades essenciais, como o forrageamento, o cuidado com a prole e a manipulação do lixo sofrem com a ausência desse indivíduo que, além de garantir a reprodução, promove a coesão dos membros do formigueiro (DELLA LUCIA et al., 2003).

As iscas comerciais utilizadas para o controle das formigas-cortadeiras apresentam um tempo de paralisação do corte e morte da colônia muito inferiores aos apresentados pela isca artesanal contendo a azadiractina (FORTI et al., 2007). Porém, é importante notar que a azadiractina provocou efeitos deletérios em aspectos importantes das colônias, como a aquisição de recursos e higienização do ninho, além disso, essa substância reduziu significativamente a sobrevivência das operárias e a capacidade reprodutiva das rainhas, o que já foi evidenciado em outros estudos (AMARAL et al., 2018, 2019).

O tempo de ação da azadiractina pode ser otimizado com a associação desse composto a outros agentes de controle. Estudos com diversos compostos extraídos de plantas já evidenciaram ação inseticida e/ou fungicida de metabólitos produzidos pelos vegetais (BOULOGNE et al., 2012). A ação de fungos entomopatogênicos e de substâncias imunossupressoras também podem ser utilizadas nesse sentido (BIZARRIA et al., 2018; DORNELAS et al., 2017). Esses agentes, além de impactarem a capacidade das colônias de

resistirem aos métodos de controle, podem contribuir para uma redução na quantidade de ingrediente ativo necessária para o controle dessas formigas, o que traz benefícios significativos ao ambiente e aos organismos benéficos.

## **5 CONCLUSÕES**

A isca de azadiractina se mostrou promissora no controle das formigas-cortadeiras, por provocar a redução no consumo foliar das colônias após o seu oferecimento, bem como por reduzir a taxa de remoção de lixo pelas operárias. Ambos os efeitos culminaram com a morte das colônias. Este estudo sugere um grande potencial de utilização da azadiractina como ingrediente ativo no controle desses insetos-pragas.

## REFERÊNCIAS

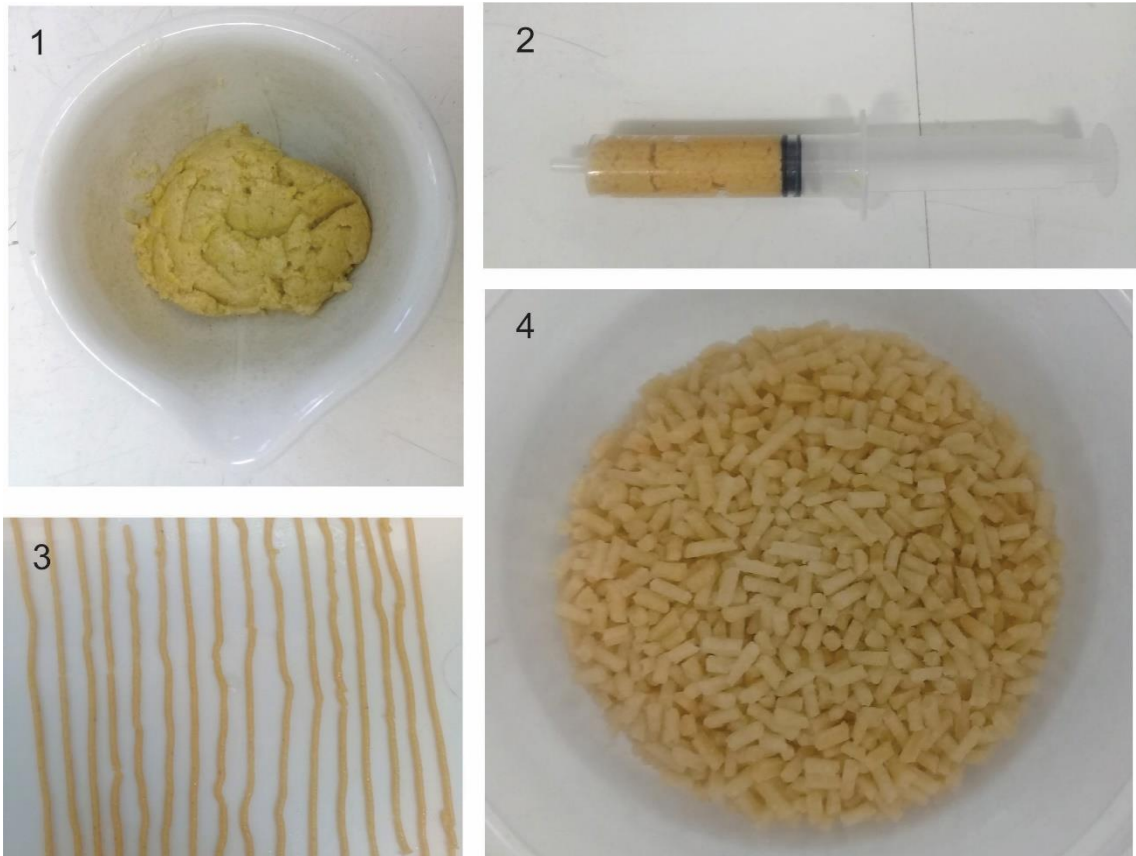
- AMARAL, K. D. et al. Azadirachtin impairs egg production in *Atta sexdens* leaf-cutting ant queens. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 809–814, dez. 2018.
- AMARAL, K. D. et al. Effect of azadirachtin on mortality and immune response of leaf-cutting ants. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 10, p. 1190–1197, 2019.
- 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.
- ARENAS, A.; ROCES, F. Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2017.
- BIZARRIA, R. et al. Soluble compounds of filamentous fungi harm the symbiotic fungus of leafcutter ants. **Current Microbiology**, v. 75, p. 1602–1608, 2018.
- BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325–347, 2012.
- BRITTO, J. S. DE et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Reserch in Environmental Studies**, v. 3, n. May, p. 11–92, 2016.
- CHAUDHARY, S. Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2017.
- DA SILVA CAMARGO, R.; PUCCINI, C.; FORTI, L. C. Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: Contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. **Insects**, v. 8, n. 2, 2017.
- DE ANDRADE, A. P. P. et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, v. 40, n. 2, p. 293–306, 2002.
- DELABIE, J. H. C. et al. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 80–101.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O. Caracterização de ninhos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG, Brazil: Folha de Viçosa, 1993. p. 32–42.
- DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.
- DELLA LUCIA, T. M. C. et al. Colony behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in the absence of the queen under laboratory conditions. **Behavioural Processes**, v. 64, p.49-55, 2003.

- DORNELAS, A. S. P. et al. Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.3, p.133-136, 2017.
- FORTI, L. C. et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, n. 3, p. 1149–1163, 2007.
- FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; RAMOS, V. M. Biologia e comportamento de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae): implicações no seu controle. **Série Técnica IPEF, FCA/UNESP**, v. 13, p. 103–114, 2000.
- FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO, D. R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: BERTI FILHO, E.; MARICONI, F.A.M.; FONTES, L.R. (Eds.). **Anais do Simpósio sobre Formigas Cortadeiras dos Países do Mercosul**, Piracicaba, Brazil. FEALQ, Piracicaba. 1998.p. 113–132.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. New York, NY: W. W. Norton & Company, 2009.
- JANDT, J. M. et al. Behavioural syndromes and social insects: Personality at multiple levels. **Biological Reviews**, v. 89, p. 48-67, 2014.
- KNAPP, J. J.; HOWSE, P. E.; KERMARREC, A. Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE', K (Eds.). **Applied Myrmecology: a World Perspective**. Boulder, Colorado: Westview Press, 1990. p. 382–409.
- LEE, C. Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review. **Journal of Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 107–112, 2000.
- LIMA, C. A et al. Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. September, p. 497–501, 2003.
- MORDUE, A. J. et al. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science**, v. 54, n. 3, p. 277–284, 1998.
- MORGAN, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4096–4105, 2009.
- NAGAMOTO, N. S. et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44(2), p. 413–431, 2004.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Ant diversity in an area of the Amazon Forest in Acre, Brazil. **Sociobiology**, v. 54, n. 1, p. 243–267, 2009.
- PEREGRINE, D. J.; CHERRETT, J. M. A field comparison of the modes of action of aldrin and mirex for controlling colonies of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v. 63, p. 609–618, 1974.
- R CORE TEAM. 2019. R: **A language and environment for statistical computing**. R

Foundation for 721 Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

SAVERSCHEK, N. et al. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 3, p. 689–698, 2010.

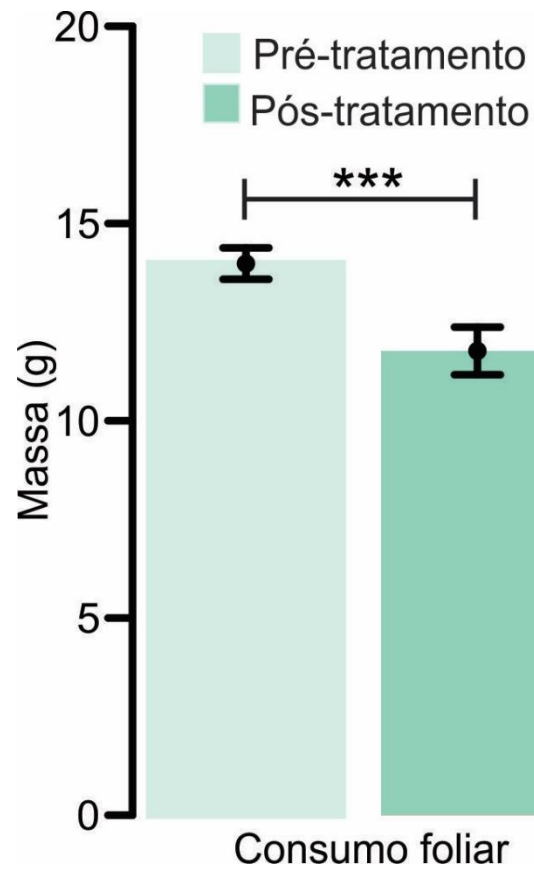
SCHMUTTERER, H. Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions ? **Zeitschrift Für Angewandte Entomologie**, v. 100, n. 5, p. 468–475, 1985.



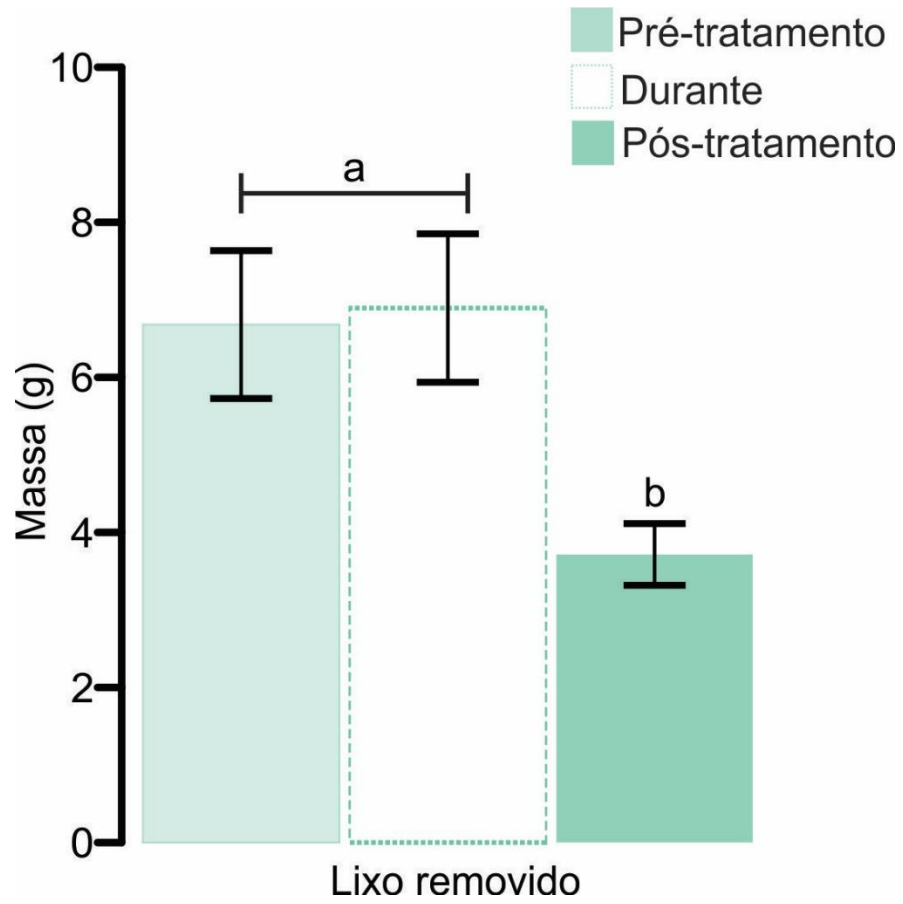
**Figura 1:** Etapas da confecção da isca artesanal contendo azadiractina. (1) Mistura dos ingredientes. (2) Moldagem da massa com auxílio de uma seringa descartável. (3) Secagem da massa moldada em estufa. (4) Grânulos secos e cortados.



**Figura 2:** Isca de azadiractina sendo incorporada por uma colônia de *Atta sexdens* no laboratório. As setas vermelhas apontam os fragmentos de isca sendo incorporado às hifas do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.



**Figura 3:** Consumo foliar médio diário antes e após o tratamento com isca contendo azadiractina. O asterisco indica diferença significativa pelo teste t de Student' a 5% de significância (\*\*\*)  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ).



**Figura 4:** Massa média diária de lixo removido nos períodos pré, durante e pós tratamento com isca contendo azadiractina. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de contrastes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 5:** Colônia de *Atta sexdens* em laboratório. (A) Antes e (B) após cinco meses do oferecimento de iscas contendo azadiractina. Observa-se a ausência (morte) de todos os indivíduos da colônia, bem como, do jardim de fungo.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho fornece subsídios para a compreensão dos mecanismos de ação da azadiractina na oviposição das rainhas, bem como, avalia os efeitos dessa substância em outros parâmetros da colônia, como no desenvolvimento do fungo simbiote e em atividades cruciais como o forrageamento e a limpeza do ninho. Além disso, o desenvolvimento da isca com azadiractina, traz subsídios para a forma de veiculação do composto nos ninhos de cortadeiras, devido à sua atratividade e eficiência.

A azadiractina apresentou diferentes modos de ação em diversos aspectos das colônias de formigas-cortadeiras. No âmbito reprodutivo, a azadiractina reduziu a oviposição das rainhas de *Atta sexdens* por inibir o desenvolvimento de seus ovos pela baixa deposição de proteínas de reserva, uma vez que a azadiractina reduziu a síntese de vitelogeninas, precursora das principais proteínas presentes no vitelo.

Em relação ao fungo simbiote, a azadiractina inibiu o crescimento do *Leucoagaricus gongylophorus*, pois reduziu a massa e a quantidade de hifas produzidas. A qualidade nutricional do fungo não foi afetada. A diminuição da quantidade de hifas produzidas reflete diretamente na quantidade de nutrientes fornecidos às formigas.

A isca à base de azadiractina mostrou-se promissora no controle das formigas-cortadeiras, por provocar a redução no consumo foliar das colônias após o seu oferecimento, bem como por reduzir a taxa de remoção de lixo pelas operárias, atividade essencial na higienização do ninho. Ambos os efeitos culminaram com a morte das colônias em pouco tempo.

Com base no exposto, é possível identificar potencial de utilização da azadiractina no controle das formigas-cortadeiras.