

KARINA DIAS AMARAL

**AZADIRACTINA: IMPLICAÇÕES NA IMUNIDADE, NA MORTALIDADE E
NA OVIPOSIÇÃO DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

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

T

A485a
2016
Amaral, Karina Dias, 19-
Azadiractina : implicações na imunidade, na mortalidade e
na oviposição das formigas-cortadeiras / Karina Dias Amaral. –
Viçosa, MG, 2016.
ix, 41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Terezinha Maria Castro Della Lucia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Formiga-cortadeira - Mortalidade.
 2. Formiga-cortadeira - Encapsulação.
 3. Oviposição.
 4. Formiga-cortadeira - Controle.
 5. *Azadirachtina*.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.
II. Título.

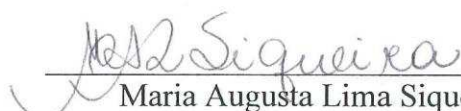
CDD 22. ed. 595.796

KARINA DIAS AMARAL

AZADIRACTINA: IMPLICAÇÕES NA IMUNIDADE, NA MORTALIDADE E NA
OVIPOSIÇÃO DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS

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

APROVADA: 16 de fevereiro de 2016.



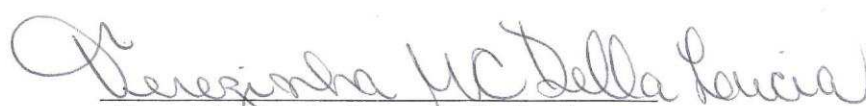
Maria Augusta Lima Siqueira
(Coorientadora)



Marco Antonio de Oliveira
(Coorientador)



Cristiano Lopes Andrade



Terezinha Maria Castro Della Lucia
(Orientadora)

**Aos meus pais, minha fonte de incentivo e amor incondicional,
Dedico**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ser sempre meu caminho de luz e verdade.

Aos meus amados pais, João Batista e Edma, por todo amor, amizade e incentivo constantes, e por sempre confiarem que eu alcançaria meus objetivos me dando apoio incondicional. Amo vocês e sou muito grata por tudo.

Às minhas queridas irmãs Clarice e Janaína por todo o cuidado, incentivo e carinho de sempre, e por serem minhas melhores amigas. Amo muito vocês.

Aos meus familiares, avó, tios(as), primos(as) e cunhados por toda torcida e por ficarem felizes com minhas conquistas.

À professora Terezinha pela orientação, amizade e carinho ao longo dos anos. Muito obrigada por ser uma grande “mãe” e profissional exemplar.

Aos membros da banca, professora Maria Augusta e professores Marco Antonio e Cristiano, pela disponibilidade e sugestões valiosas no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de formigas-cortadeiras. Meus queridos “laevigatinhos” Joel, Bressane e Lailla, pela ajuda na execução deste trabalho e por todos os momentos de diversão e conselhos. Ao Sr. Manuel pelo auxílio fundamental nas coletas e manutenção das colônias, e por toda amizade.

À Bio 2009 e agregados por serem minha segunda família. Agradeço pelos sempre inesquecíveis momentos felizes que vivemos nesses anos e por serem apoio nas horas difíceis. Que nossa amizade e companheirismo sejam constantes, apesar da distância.

Agradeço ao meu grande amigo Paulo, minha companhia de todas as horas, pelo apoio fiel e constante. Às minhas “meninas” Larissinha, Vanessa, Nay, Karine e Lis, por serem amigas tão especiais. Amo muito vocês.

Aos amigos de Ubá e Viçosa pela amizade e carinho sinceros.

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

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de estudo e aos funcionários e professores pelo suporte durante o curso.

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

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse
sonho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

KARINA DIAS AMARAL, terceira filha de João Batista do Amaral e Maria Edma Dias Amaral, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 11 de Janeiro de 1991.

Concluiu o Ensino Médio em Dezembro de 2008, na Escola Estadual Senador Levindo Coelho, em Ubá, Minas Gerais.

Em Março de 2009, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa. Em outubro de 2009 iniciou estágio no Laboratório de Formigas-cortadeiras. Graduiu-se Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas em março de 2014.

Em Março de 2014, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação no dia 16 de Fevereiro de 2016.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1- Formigas-cortadeiras.....	1
1.2- Sistema imune	1
1.3- Oviposição e desenvolvimento	3
1.4- Azadiractina	4
1.5- Objetivos	5
2- REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO I- EFEITO DA AZADIRACTINA NA IMUNIDADE INDIVIDUAL E SOCIAL DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS	11
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1- INTRODUÇÃO	13
2- MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1- Manutenção das colônias	15
2.2- Taxa de encapsulação sob efeito da azadiractina.....	15
2.3- Efeito da azadiractina na imunidade social das operárias	16
2.4- Análise estatística	16
3- RESULTADOS.....	17
3.1- Taxa de encapsulação sob efeito da azadiractina.....	17
3.2- Mortalidade associada à imunidade social	17
4- DISCUSSÃO	21
5- REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO II- EFEITO DA AZADIRACTINA NA MORTALIDADE DAS OPERÁRIAS E NA OVIPOSIÇÃO DAS RAINHAS	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1- INTRODUÇÃO	27
2- MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1- Mortalidade sob efeito da azadiractina	28
2.2- Efeito da azadiractina na oviposição de rainhas	28
2.3- Análise estatística	29

3- RESULTADOS	30
3.1- Efeito da azadiractina na mortalidade das operárias	30
3.2- Efeito da azadiractina na taxa de oviposição das rainhas.....	30
4- DISCUSSÃO	35
5- REFERÊNCIAS	38
CONCLUSÕES GERAIS	40
ANEXO	41

RESUMO

AMARAL, Karina Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Azadiractina: implicações na imunidade, na mortalidade e na oviposição das formigas-cortadeiras.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Coorientadores: Maria Augusta Lima Siqueira e Marco Antonio de Oliveira

As formigas-cortadeiras, importantes pragas agrícolas e florestais, possuem eficiente sistema de defesa contra os patógenos, dificultando o seu controle. Essas formigas também são capazes de selecionar os vegetais que cortam e assim, evitar determinadas plantas com compostos danosos a elas ou a seu fungo simbiote. Por isso, plantas que são evitadas geralmente apresentam substâncias com ação potencial contra as cortadeiras, como o Nim (*Azadirachta indica*), que possui a azadiractina, composto tóxico a diversos insetos. Objetivou-se avaliar a taxa de encapsulação por operárias de *Atta sexdens* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* após a aplicação tópica de solução à base de azadiractina, bem como comparar a taxa de mortalidade de operárias mantidas solitárias com a daquelas mantidas agrupadas e sob fornecimento de dieta contendo a substância, quando confrontadas com o patógeno *Metarhizium anisopliae*. Além disso, verificou-se a taxa de mortalidade das operárias após aplicação tópica de diferentes concentrações do produto, bem como o efeito de sua aplicação tópica e em dieta na oviposição das rainhas. A azadiractina não afetou a taxa de encapsulação das operárias, isto é, a capacidade das mesmas de encapsularem um patógeno. O oferecimento da dieta contendo essa substância e posterior exposição das formigas ao patógeno *M. anisopliae* também não afetou a mortalidade das operárias, e o fato de estarem em grupo não favoreceu a sobrevivência das mesmas, porém *Ac. subterraneus subterraneus* apresentou taxa de mortalidade menor que *A. sexdens*. Por outro lado, a aplicação tópica de azadiractina causou mortalidade significativa nas operárias das duas espécies, proporcional ao aumento da concentração da substância. A azadiractina também reduziu a taxa de oviposição de rainhas de *A. sexdens* tanto por meio de aplicação tópica quanto por oferecimento em dieta. Em *Ac. subterraneus subterraneus* apenas a aplicação tópica afetou a oviposição das rainhas. Além disso, o tempo interferiu de forma positiva na taxa de postura de ovos no controle de *A. sexdens*; nos demais grupos não se mostrou correlação entre o tempo e a postura. Diante do exposto, a azadiractina se mostra uma potencial substância no controle das formigas-cortadeiras, principalmente por seus efeitos na oviposição das rainhas e na mortalidade das operárias.

ABSTRACT

AMARAL, Karina Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Azadirachtin: implications on immunity, on mortality and on oviposition of leaf-cutting ants.** Adviser: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-advisers: Maria Augusta Lima Siqueira and Marco Antonio de Oliveira.

The leaf-cutting ants, important agricultural and forest pests, have an efficient defense system against pathogens that makes their control difficult. These ants are also able to choose the plants they cut, thus avoiding those that may contain chemicals that are unsafe to them or to their symbiotic fungus. Hence, plants such as Neem (*Azadirachta indica*), that is avoided, hold a substance, the azadirachtin, that is toxic to many insects. In this work, a solution of this substance was applied topically to workers of *Atta sexdens* and of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* to determine if it interferes with the ants' encapsulation rate and also interferes, in addition, in altering the mortality of ants kept solitary or in groups that are given a diet containing the substance, when the ants are put in contact with the pathogen *Metarhizium anisopliae*. Moreover, the workers' mortality rate was evaluated after the application of azadirachtin in solutions of several concentrations, as well as its effect in a topical use or in a diet on the oviposition of the queens. Azadirachtin did not change the encapsulation rate by the workers, that is, it did not alter the ants' ability of disabling a pathogen. Submitting a diet with azadirachtin followed later by the pathogen *M. anisopliae* also did not affect the mortality of the ants. Ants kept in groups did not have higher survival rates, although *Ac. subterraneus subterraneus* did show reduced mortality than the other species. On the other hand, topical application of azadirachtin increased mortality of both species, mortality that was proportional to the concentration of the substance. The ingredient also reduced oviposition by queens of *A. sexdens*, both as a topical solution or in a diet. *Ac. subterraneus subterraneus* was influenced only by the topical application. No correlation was found between time and oviposition, except in the control group of *A. sexdens*. Considering all this, azadirachtin has a potential of controlling leaf-cutting ants but only because of its effect on oviposition by queens and mortality of workers.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Formigas-cortadeiras

As formigas-cortadeiras, bem como os demais táxons de Attini, cultivam o fungo simbiote do qual se alimentam. Essa relação simbiótica surgiu há 50 milhões de anos nas florestas úmidas da América do Sul (Wilson, 1971; Schultz & Brady, 2008). No entanto, o surgimento dos gêneros especializados no corte de partes vivas de plantas para o cultivo do fungo simbiote, *Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr, ocorreu muito tempo depois, entre 5-15 milhões de anos atrás (Schultz & Brady, 2008). Relatos sobre as formigas-cortadeiras datam da época do descobrimento do Brasil (Mariconi, 1970). Das muitas espécies com ocorrência constatada no Brasil – nove do gênero *Atta* (Della Lucia, 1993; Baccaro, 2015) e vinte e quatro do gênero *Acromyrmex* (Mayhé-Nunes, 1991; Baccaro, 2015) – algumas poucas são pragas, mas essas trazem prejuízos consideráveis para a agricultura brasileira.

Atta sexdens Forel, conhecida popularmente como saúva-limão, é considerada uma das saúvas mais importantes dentre aquelas com ocorrência constatada no Brasil. Ela é encontrada nos estados brasileiros que possuem maior área de floresta de *Eucalyptus* L'Hér e demonstra grande capacidade de adaptação a ambientes antropizados. No Brasil, existem registros de ocorrências que indicam sua presença nos estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Acre (Della Lucia, 1993; Delabie et al., 2011; Oliveira et al., 2009).

Acromyrmex subterraneus *subterraneus* Forel, conhecida como formiga caiapó, é uma espécie de formiga-cortadeira frequentemente encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Amazonas (Pereira & Della Lucia, 1998). Possui ninhos relativamente grandes quando comparados aos de outras espécies do gênero (Della Lucia & Moreira, 1993). Dentro do gênero *Acromyrmex*, é uma das mais importantes, pois além de populosas, as colônias causam danos severos em pastagens e áreas de reflorestamento (Della Lucia, 2011; Delabie et al., 2011).

1.2- Sistema imune

Os insetos sociais, por viverem em ninhos de alta densidade populacional e com indivíduos muito aparentados geneticamente entre si, estão predispostos a sérios riscos de epidemia (Roff, 1992; Stearn, 1992). Por isso, são capazes de responder efetivamente a invasores estranhos como parasitas e patógenos, utilizando o seu sistema imune inato,

que incluem respostas celulares e humorais (Gillespie et al., 1997). Entretanto, o sistema imune dos insetos é relativamente simples quando comparado ao dos vertebrados, uma vez que não está baseado em anticorpos e não possui uma memória imunológica (Rolff & Siva-Jothy, 2003).

Com relação às adaptações fisiológicas, as formigas possuem eficiente sistema imune inato, semelhante aos demais invertebrados, o qual lhes permite combater os principais microrganismos patogênicos. O sistema imune humoral envolve moléculas extracelulares presentes na hemolinfa. As defesas humorais incluem a reação em cascata da enzima fenoxidase, que culmina na produção da melanina, cujos intermediários são tóxicos para um dado patógeno, agindo na limitação ou infecção causada por ele (Narayanan, 2004; Cerenius & Söderhäll, 2004). Também, após ser infectado por um parasita, ou simplesmente por ter a cutícula rompida, o inseto desencadeia a síntese de peptídeos antimicrobianos, sintetizados principalmente pelas células do corpo gorduroso, os quais podem ter uma função generalista ou mais específica (Nation, 2008). As defesas celulares incluem as reações de fagocitose do organismo invasor por uma única célula ou reações multicelulares, encapsulação e formação de nódulos. Esses processos são todos mediados pelos hemócitos dos hospedeiros (Strand, 2008).

As colônias dos insetos sociais também possuem um sistema de defesa imunológico coletivo contra os seus parasitas. Esse sistema de imunidade social resulta da cooperação de membros individuais do grupo para combater os riscos crescentes de transmissão de infecções que surgem da própria vida em grupo (Cremer et al., 2007; Ugelvig & Cremer, 2007). As defesas coletivas podem ser profiláticas e ativadas segundo as necessidades da colônia e consistem de adaptações comportamentais, fisiológicas e organizacionais do ninho, as quais, conjuntamente, previnem a entrada do parasita, seu estabelecimento e sua disseminação (Jaccoud et al., 1999).

Os mecanismos comportamentais encontrados nas cortadeiras - como trofalaxia, allogrooming, autogrooming e evitação de contato com indivíduos infectados – podem explicar a imunidade dessas formigas em relação a importantes patógenos como *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Bextine & Thorvilson, 2002; Oi & Pereira, 1993). Esses podem ser encontrados em alta abundância próximos a ninhos de formigas-cortadeiras; no entanto, as operárias não se encontram, normalmente, infectadas (Hughes et al., 2004). Acrescenta-se a isto a complexa associação delas com bactérias actinomicetos, sobretudo nas espécies de

Acromyrmex, que podem lhes fornecer proteção adicional por meio da produção de substâncias antibióticas (Currie et al., 1999).

Outro fator que contribui para a eficiência da imunidade social das formigas é a presença das glândulas metapleurais, um par de glândulas exócrinas localizadas na porção terminal da região póstero-lateral do mesossoma desses insetos (Hölldobler & Engel-Siegel, 1984). A função primária dessa glândula é o controle das infecções pela síntese de inúmeros compostos antimicrobianos. Porém, em algumas espécies, ela também atua na liberação de ferômonios que auxiliam as operárias na defesa da colônia e no reconhecimento dos hidrocarbonetos cuticulares entre as companheiras de ninho (Brown 1968; Jaffe´ & Puche 1984). Assumia-se que secreção dessa glândula ocorria de forma passiva (Attygalle et al., 1989; Schoeters & Billen 1993; North et al., 1997), porém, em espécies do gênero *Atta*, a secreção da glândula aumentou após exposição à um patógeno (Fernández-Marín, 2006) e a frequência de allogrooming, processo no qual as operárias lambem as companheiras de ninho; por outro lado, não aumenta com a secreção, indicando que o uso desses compostos não é indiscriminado, uma vez que são substâncias caras, energeticamente (Poulsen et al. 2002).

Existem muitos fatores que atuam modulando a resposta imune do inseto como o sexo, a idade, a disponibilidade de recursos e a interferência de parasitas (Schmid-Hempel, 2003). Igualmente, alguns elementos químicos podem interferir na sua resposta imune, por exemplo, os metais pesados como arsênico, cádmio e chumbo (Sorvari et al., 2007). Além disso, a qualidade nutricional pode afetar diretamente a resposta imune dos insetos (Klemola et al., 2007).

1.3- Oviposição e desenvolvimento

A reprodução das formigas-cortadeiras consiste, basicamente, na revoada ou voo nupcial, seguido do acasalamento e estabelecimento de uma nova colônia (Hölldobler; Wilson, 1990).

Em *A. sexdens*, a fundação do formigueiro é realizada por uma única rainha e as colônias permanecem monogínicas, característica desse gênero. Além disso, a fundação é claustral, ou seja, uma vez estabelecido o ninho, a rainha se fecha na câmara inicialmente construída para a criação de sua prole (Araújo et al., 2011).

Cinco a seis dias após o início da escavação do ninho, as rainhas iniciam a oviposição (Hölldobler; Wilson, 1990), e as primeiras larvas começam a emergir em torno de 24 dias. Os adultos surgem entre 62 e 66 dias após (Mariconi, 1970). As

primeiras operárias geralmente são mínimas e realizam atividades de forrageamento, corte e transporte de vegetais bem como o cuidado com a prole, diferentemente de colônias mais velhas nas quais essas operárias não realizam todas essas funções (Hölldobler; Wilson, 1990). Os ninhos de *A. sexdens* possuem, em média, durante a vida, 5 a 8 milhões de operárias (Riley et al., 1974), porém esses valores variam de acordo com o número de espermatozoides presentes na espermateca e a taxa de oviposição das rainhas (Araújo et al., 2011).

Em *Ac. subterraneus subterraneus*, os ninhos podem ser fundados por uma ou muitas rainhas e, portanto, podem ser mono ou poligínicos (Diehl-Fleig, 1995). Além disso, a fundação dos ninhos nessa espécie é considerada semiclaustral (Araújo et al., 2011), ou seja, a rainha pode sair na busca por material vegetal, para o desenvolvimento de seu fungo simbiote (Rissing et al., 1986). Após a emergência das primeiras operárias, as rainhas passam a realizar somente a oviposição, enquanto as operárias desempenham as demais tarefas da colônia (Hölldobler; Wilson, 1990). Segundo Pereira e Della Lucia (1998) o número de operárias nas colônias de *Ac. subterraneus subterraneus* é bastante variado.

Vários fatores podem afetar a fisiologia da rainha e, conseqüentemente, sua taxa de oviposição. Variações na temperatura afetaram negativamente a taxa de oviposição das rainhas da formiga poligínica *Linepithema humile* Mayr (Abril et al., 2006). Além disso, segundo os autores, o número de rainhas por ninho afeta diretamente o desempenho individual de cada uma delas, sendo que, quanto maior o número de rainhas, menor o número de ovos postos por cada uma delas. Os autores também observaram que geralmente uma das rainhas contribui significativamente mais para o total de ovos.

Outros fatores podem afetar o desempenho das rainhas, como, por exemplo, a aplicação de substâncias tóxicas. A abamectina, produzida por actinomicetos do solo, se em doses subletais, causou a diminuição do número de ovariolos por ovários e de oócitos por ovariolos em rainhas de *Ac. subterraneus subterraneus*, causando sua esterilidade em doses maiores (Antunes et al., 2000).

1.4- Azadiractina

A azadiractina consiste em um tetranotriterpenoide ativo extraído do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), conhecido por suas propriedades no controle de diversos insetos. Esse composto é encontrado em maiores concentrações nas sementes de Nim,

apesar de existirem algumas moléculas ativas nas folhas dessa planta, porém em baixas quantidades (Mordue & Nisbet, 2000).

A azadiractina é considerada um potente inibidor de alimentação em muitos insetos. Inicialmente, esse efeito se deve à estimulação de células associadas à deterrência nos quimiorreceptores, bloqueando as células receptoras que estimulam a alimentação (Blaney et al. 1990). Além disso, esse composto possui efeitos antialimentares secundários, que surgem após o contato ou ingestão da substância, como, por exemplo, a inibição da produção de enzimas digestivas e efeitos no sistema nervoso estomatogástrico (Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000).

Ao nível fisiológico, a azadiractina bloqueia a liberação do hormônio protoracicotrópico que controla a função da glândula protorácica, inibindo, dessa forma, a síntese e a liberação do hormônio de muda (ecdisteroides), ocasionando uma ecdise incompleta nas formas imaturas (Isman, 2006). Em insetos adultos já foram relatados seus efeitos negativos na reprodução de machos e fêmeas. Nas fêmeas, a azadiractina inibe a oogênese e a síntese de ecdisteroides ovarianos, impedindo a oviposição (Rembold & Sieber, 1981).

Um estudo com o percevejo *Rhodnius prolixus* demonstrou o efeito imunossupressor da azadiractina (Azambuja et al., 1991). Segundo os autores, houve uma diminuição do número de hemócitos na hemolinfa dos insetos após se alimentarem da substância, bem como, uma diminuição na formação de nódulos, sob efeito da azadiractina, após serem infectados com dado patógeno.

A azadiractina é utilizada no controle de diversos insetos-praga, sendo considerada um biopesticida de baixa toxicidade à mamíferos, peixes e polinizadores (Isman, 2006). Porém, poucos são os estudos que investigam seus efeitos como possível agente controlador das formigas-cortadeiras.

1.5- Objetivos

Com base no exposto, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da azadiractina na mortalidade e na resposta imune de operárias de *A. sexdens* e *Ac. subterraneus subterraneus* no âmbito individual e social, bem como avaliar seu efeito na oviposição das rainhas.

Os objetivos específicos são:

- 1) avaliar a taxa de encapsulação das operárias das duas espécies após a aplicação tópica de solução à base de azadiractina, bem como, comparar a taxa de mortalidade de operárias mantidas solitárias com a daquelas mantidas em grupo sob fornecimento de dieta contendo azadiractina quando confrontadas com o patógeno *Metarhizium anisopliae*;
- 2) verificar a taxa de mortalidade das operárias após aplicação tópica de diferentes concentrações de azadiractina, além de avaliar o efeito da aplicação tópica e do oferecimento de dieta à base de azadiractina na oviposição das rainhas.

2- REFERÊNCIAS

- Abril S, Oliveras J, Gómez C. 2008. Effect of temperature on the oviposition rate of Argentine ant queens (*Linepithema humile* Mayr) under monogynous and polygynous experimental conditions. *Journal of Insect Physiology*, **54**, p. 265–272.
- Antunes, E. C., R.N.C. Guedes, T.M.C. Della-Lucia & J. E. Serrão. 2000. Sub-lethal effects of abamectin suppressing colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Pest Management Science*, **56**, p. 1059–1064.
- Araújo, M.S; Ribeiro, M.M.R; Marinho, C.G.S.;Oliveira , M.A & Della Lucia, T.M.C.. 2011. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: Della Lucia, T.M.C (ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**, p. 173-188.
- Attygalle, A. B.; Siegel, B.; Vostrowsky; O., Bestmann, H. J. & Maschwitz, U. 1989. Chemical composition and function of metapleural gland secretion of the ant, *Crematogaster deformis* Smith (Hymenoptera: Myrmicinae). *Journal of Chemical Ecology*, **15**, p.317–328.
- Azambuja, P., E.S. Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Warthen Jr, J.D. 1991 Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. *Journal of Insect Physiology*, **37**, p.771-777.
- Baccaro, F.B.; Feitosa, R.M.; Fernandez, F.; Izzo, T.J.; Fernandes, I.O.; Souza, J.L.P.; Solar,R.2015.**Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Ed. Inpa, Manaus, p. 206-212.
- Bextine, B.R. & Thorvilson, H.G. 2002. Field applications of bait-formulated *Beauveria bassiana* alginate pellets for biological control of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental Entomology*, **31**, p. 746-752.
- Blaney, W.M., M.S.J. Sommonds, W.V. Ley, J.C. Anderson & P.L. Toogood. 1990. Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **55**, p. 149-160.
- Brown, W. L. 1968. An hypothesis concerning the function of the metapleural glands in ants. *The American Naturalist*, **102**, p. 188–191.
- Cerenius, L.; Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, p. 116-126.
- Cremer S, Armitage S.A., Schmid-Hempel P. 2007. **Social immunity**. *Curr Biol* 17:R, p.693–702.
- Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C. & Malloch, D. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, **398**, p.701-704.
- Delabie, J.H.C.; Alves, H.S.R.; Reuss-Strenzel, G.M.; 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**, p. 80-101.
- Della Lucia, T.M.C. 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**, p. 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**, p.32-42.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Anjos, N & Moreira, D.D.O. 1993. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia, T.M.C. (ed) **As formigas cortadeiras**, p.151-162.
- Diehl-Fleig, E. 1995. **Formigas: organização social e ecologia comportamental**. Ed. Unisinos, 166pp.
- Fernández-Marín, H.; Zimmerman, J. K.; Rehner, S. A.; Wcislo, W. T. 2006. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **273**, p. 1689–1695.
- Garcia, J. F.; Grisoto, E.; Vendramim, J. D.; Botelho, P. S. 2006. Bioactivity of neem, *Azadirachta indica*, against spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. *Journal of Economic Entomology*, **99**, p. 2010-2014.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. & Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, **42**, p. 611-643.
- Hölldobler B.; Engel-Siegel H. 1984. On the metapleural gland of ants. *Psyche*, **91**, p. 201-224.
- Hölldobler B., Wilson E.O. 1990. **The ants**. Springer, Berlin Heidelberg, New York. 782 pp.
- Hughes, W.O.; Thomsen, L.; Eilenberg, J. & Boomsma, J.J. 2004 Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a Neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**, p. 46-53.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology, Stanford*, **51**, p.45–66.
- Jaccoud, D.B., Hughes, W.O.H., Jackson, C.W. 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **93**, p. 51-61.
- Jaffe', K. & Puche, H. 1984. Colony-specific territorial marking with the metapleural gland secretion in the ant *Solenopsis geminata* (Fabr.). *Journal of Insect Physiology*, **30**, p.265–270.

- Klemola, N., Klemola, T., Rantala, M.J., Ruuhola, T. 2007. Natural host-plant quality affects immune defence of an insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **123**, p.167-176.
- Mariconi, F.A.M. 1970. **As saúvas**. São Paulo Agronômica Ceres, 167pp.
- Mayhé-Nunes, A. J. 1991. **Estudo de Acromyrmex (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética**.122f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Mordue (Luntz), A.J. & Nisbet, A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, **24**, p. 615-632.
- Narayanan, K. 2004. Insect defense: its impact on microbial control of insect pest. *Current Science*, **86**, p.800-813.
- Nation, J.L. 2008. **Insect physiology and biochemistry**. CRC Press, 560pp.
- North, R. D.; Jackson, C. W. & Howse, P. E. 1997. Evolutionary aspects of ant–fungus interactions in leafcutting ants. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**, p.386–389.
- Oi, D.H. & Pereira, R.M. 1993. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera, Formicidae). *Florida Entomologist*, **76**, p.63-74.
- Oliveira, M. A; Della Lucia, T.M.C; Marinho, C.G.S., Delabie, J.H.C; Morato, E.F. (2009). Ant diversity in an area of the amazon forest in Acre, Brazil. *Sociobiology*, **54**, p. 243-268.
- Pereira R.C., Della Lucia T.M.C. 1998. Estimativa populacional em ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Ceres*, **45**, p.573-578.
- Poulsen, M.; Bot, A. N. M.; Nielsen, M. G.; Boomsma, J. J. 2002. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **52**, p. 151-157.
- Rembold, H. & K.P. Sieber. 1981. Inhibition of oogenesis and ovarian ecdysteroid synthesis by azadirachtin in *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). *Zeitschrift für Naturforschung*, **36**, p.466-469.
- Riley, R.G.; Silverstein, R.M.; Moser, J.C. 1974. Isolation, identification, synthesis and biological activity of volatile compounds from the head of *Atta* ants. *Journal of Insect Physiology*, **20**, p. 1629-1637.
- Rissing, S. W.; Johnson, R.A.; Pollock, G.B. 1986. Natal nest distribution and pleometrosis in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Pergande) (Hymenoptera:Formicidae). *Psyche*, **93**, p.177-186.

- Roff, D.A. 1992. **The evolution of life histories: Theory and analysis**. New York: Chapman & Hall, 523pp.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science*, **301**, p. 472-475.
- Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **270**, p.357-366.
- Schoeters, E. & Billen, J. 1993. Anatomy and fine structure of the metapleural gland in *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). *Belgian Journal of Zoology*, **123**, p.67-75.
- Schultz, T.R.; Brady, S.G. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, **14**, p. 5435-5440.
- Sorvari, J., Rantala, L.M., Ranta, M.J., Hakkarainen, H. & Eeva, T. 2007. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. *Environmental Pollution* **145**, p.324-328.
- Stearns, S.C. 1992. **The evolution of life histories**. New York: Oxford University Press, 247pp.
- Strand, M.R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, **15**, p. 1-14.
- Ugelvig, L.V. & Cremer, S. 2007. Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Current Biology*, **17**, p.1967-1971.
- Wilson, E.O. 1971. **The insects societies**. Cambridge: Belknap Press of the Harvard University Press, 562pp.

CAPÍTULO I

Efeito da azadiractina na imunidade individual e social das formigas-cortadeiras

RESUMO

As formigas-cortadeiras são pragas de difícil controle, pois possuem inúmeras estratégias de defesa e sistema de seleção dos vegetais que cortam. Apesar dos danos que causam ao ambiente, os produtos químicos ainda são as estratégias de controle mais utilizadas contra esses insetos. A busca por substâncias que causem menos impactos na natureza é uma constante nessa área de pesquisa. A azadiractina, extraída do Nim, é uma alternativa no controle de diversas pragas, por possuir baixa toxicidade a mamíferos e polinizadores e ser degradada facilmente no ambiente. Porém, poucos são os estudos do efeito desse composto nas cortadeiras. Com isso, objetiva-se neste capítulo avaliar o efeito da azadiractina na resposta imune das formigas-cortadeiras das espécies *A. sexdens* e *Ac. subterraneus subterraneus* no âmbito individual e social. Para isso, estudou-se a taxa de encapsulação por operárias após a aplicação tópica de solução à base de azadiractina e a existência de diferenças nas taxas de mortalidade de operárias mantidas solitárias com a das mantidas em grupo sob fornecimento de dieta contendo azadiractina, quando confrontadas com o patógeno *Metarhizium anisopliae*. A azadiractina aplicada topicamente não aumentou a taxa de encapsulação das operárias das duas espécies. Do mesmo modo, a dieta à base de azadiractina não afetou a mortalidade das operárias diante do patógeno *Metarhizium anisopliae*, assim o fato de estarem em grupo não favoreceu a sobrevivência. Por outro lado, os resultados mostraram que *Ac. subterraneus subterraneus* apresentou uma mortalidade significativamente menor do que *A. sexdens*. Conclui-se que a azadiractina não afeta a capacidade de reconhecimento e encapsulação de um patógeno pelas cortadeiras, bem como sua suscetibilidade quando em grupo.

Azadirachtin effect on the individual and social immunity of leaf-cutting ants

ABSTRACT

The leaf-cutting ants are difficult pests to control, because they have numerous defense strategies and also because they select the leaves that they are to cut. Chemicals are still the most commonly used control strategies against these insects, but they cause some impact on the environment. The search for substances that produce less effect on nature is constant in this research area. Azadirachtin, a compound extracted from the Neem trees, is an alternative for the control of various pests, because it is toxic to some insects but not to animals, besides being easily degraded in the environment. There are, however, only a few studies showing the effect of that substance on leaf-cutters. Thus, the purpose of this chapter is to describe the effect of azadirachtin on the immune response of the subspecies of the leaf-cutting ants *Atta sexdens* and *Acromyrmex subterraneus subterraneus* both in the individual and in the social aspects. The rate of encapsulation of pathogens by ant workers was evaluated after the topical application of a solution containing azadirachtin; differences in mortality rates of workers kept alone or in groups after being offered a diet that contained the chemical and shortly after put in contact with the pathogen *Metarhizium anisopliae* were also assessed. Azadirachtin applied topically did not increase the encapsulation level of the workers of the two ants. Similarly, the diet also did not affect the mortality of the workers confronted with *M. anisopliae*; the fact of belonging to a group did not favor survival. Moreover, the results showed that *Ac. subterraneus subterraneus* had a mortality rate significantly lower than that of *A. sexdens*. Therefore, azadirachtin has no effect on recognition and ability of encapsulation of a pathogen by leaf-cutting ants, as well as of their susceptibility when in a group.

1- INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras são consideradas os herbívoros dominantes na região Neotropical (Hölldobler & Wilson, 1990) e, são pragas severas quando atacam plantas cultivadas (Della Lucia, 2003).

Apesar dos vários métodos existentes de combate às cortadeiras, o controle químico é o mais utilizado, sendo o único com tecnologia disponível para uso em escala comercial (Della Lucia & Araújo, 2000). Porém, as dificuldades de utilização desse método e os danos que os organosintéticos podem causar no ambiente incentivam a busca por alternativas no controle desses insetos (Kogan, 1998).

Uma vez que as cortadeiras possuem características comportamentais e fisiológicas que lhes conferem a capacidade de selecionar o material a ser cortado (Hubbell & Wiemer, 1983; Santana & Couto, 1990; Della Lucia et al., 1995; Vendramin et al., 1995), o estudo de plantas evitadas por elas no corte, provavelmente por algum efeito tóxico, é uma alternativa no desenvolvimento de novas técnicas de controle.

Além disso, em resposta aos inúmeros riscos inerentes ao seu modo de vida social, as formigas-cortadeiras possuem um arsenal eficaz para evitar os riscos de infecção, constituído de estratégias de defesas variadas. Essas defesas incluem estratégias fisiológicas e comportamentais, que agem no plano individual ou no coletivo (Gillespie et al., 1997). A busca por compostos que afetem essa complexa rede de defesas das formigas é outra vertente promissora no desenvolvimento de novas estratégias de controle dessa praga pois, com o sistema de defesa abalado, os insetos se tornam mais suscetíveis aos agentes de controle.

O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) tem se mostrado bastante promissor, devido à presença do imunossupressor azadiractina, um tetranotriterpenoide ativo, eficiente no controle de diversas pragas (Martinez, 2002). A azadiractina afeta o comportamento alimentar, o desenvolvimento das formas imaturas e a reprodução de muitos insetos (Schmutterer, 1990; Martinez, 2002), além de possuir baixa toxicidade a mamíferos (Boeke et al., 2004) e ser rapidamente degradada no solo e nas plantas (Isman, 2006).

O objetivo neste capítulo foi avaliar o efeito da azadiractina na resposta imune das formigas-cortadeiras das espécies *A. sexdens* e *Ac. subterraneus subterraneus*, tanto no âmbito individual quanto no social, através da taxa de encapsulação das operárias após a aplicação tópica de solução à base de azadiractina. Também foi verificada a

existência de uma possível variação na taxa de mortalidade de operárias mantidas solitárias com aquelas mantidas em grupo quando lhes é fornecida dieta contendo azadiractina e quando confrontadas com o patógeno *Metarhizium anisopliae*. Esse patógeno foi utilizado por ser comumente encontrado no solo próximo aos ninhos das cortadeiras, ou em operárias infectadas dentro da colônia (Hughes, 2004).

Hipotetizou-se que a azadiractina reduziria a taxa de encapsulação das operárias quando aplicada topicamente e que quando oferecida na dieta aumentaria a mortalidade e afetaria a suscetibilidade das operárias quando em grupo.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Manutenção das colônias

Foram utilizadas oito colônias de *A. sexdens* e oito de *Ac. subterraneus subterraneus*, coletadas no campus universitário da UFV e de aproximadamente três anos de idade. Essas colônias foram acondicionadas em laboratório no Insetário/DBA, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG (20°45' S 42°52' W), de acordo com a metodologia de Della Lucia et al. (1993). Todas foram mantidas em temperatura de 25±5 °C, U.R. de 75±5 % e 12:12 (L:E), e alimentadas com folhas de *Ligustrum japonicum* Thumb., *Tecoma stans* L., *Acalypha wilkesiana* Müll. Arg. e *Rosa* sp., trocadas diariamente, além de um suprimento de água. Os volumes dos jardins de fungo foram de, aproximadamente, seis litros por colônia de *A. sexdens* e quatro litros por colônia de *Ac. subterraneus subterraneus*.

2.2- Taxa de encapsulação sob efeito da azadiractina

O efeito do imunossupressor azadiractina nas operárias de *A. sexdens* e *Ac. subterraneus subterraneus* foi avaliado por meio da aplicação tópica de solução do biopesticida Azamax®, que contém 12g/L de azadiractina, na concentração de 1,2 mg/ml do princípio ativo, diluído em água. Essa concentração foi escolhida com base em testes preliminares de mortalidade para as duas espécies, que mostraram que essa concentração causou mortalidade significativa, porém com efeito mais lento que em maiores concentrações, permitindo a utilização da técnica para medir a resposta imune.

O parâmetro utilizado para medir a imunocompetência foi a taxa de encapsulação de um antígeno padronizado, um microfilamento de náilon. A introdução deste antígeno induz a reação de encapsulação e melanização, sendo um dos principais mecanismos de defesa imune em invertebrados (Gillespie et al., 1997).

Foram selecionadas 50 operárias forrageadoras (cápsula cefálica: 2,0-2,2mm) de cada um dos oito formigueiros de cada subespécie, sendo que 25 receberam 1 µL da solução de azadiractina no tórax e as outras 25 receberam um 1 µL de água .

Após terem sido mantidas por 24 horas em placas de Petri com um suprimento de água e alimento, as operárias tiveram os microfilamentos (0,12 mm de diâmetro e 1,0 mm de comprimento) inseridos no tórax, entre o segundo e terceiro pares de pernas. Após a introdução dos antígenos, as operárias foram colocadas individualmente em tubos de ensaio de vidro e, em seguida, incubadas em uma câmara bioclimatizadora a

25°C por 24 horas. Em seguida, os microfilamentos foram retirados da hemocele e montados com Entellan© resina em lâminas de microscópio (Anexo). Fotomicrografias obtidas em microscópio (Olympus BX 50, câmera Olympus QColor 3) foram analisadas no programa Image J, adotando-se que quanto mais escura a imagem, maior a taxa de encapsulação do microfilamento, à semelhança do trabalho de De Souza et al (2009).

2.3- Efeito da azadiractina na imunidade social das operárias

Os formigueiros, de ambas as espécies, foram tratados com 8g (Zanetti et al.,2002) de uma dieta sólida feita à base de pó de casca de laranja, farinha de trigo, água e óleo de soja, adaptada de Lima (2000). Os ingredientes foram misturados e dispostos em forma metálica. A dieta foi então cortada em quadrados de 4mm² e mantida em estufa a 30°C por 24h. Os formigueiros tratados receberam dieta sólida contaminada com solução de azadiractina na concentração de 1,2 mg/g de dieta. O grupo controle recebeu a mesma dieta, sem adição do inseticida.

Conforme a metodologia de Kay et al. (2014), após receberem a dieta por 15 dias, 30 operárias forrageadoras de todos os formigueiros foram selecionadas, as quais receberam 1 µL de solução de esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* na concentração de 5x10⁶ conídios/mL, selecionada a partir de resultados obtidos no trabalho de Ribeiro et al. (2012). Após esse procedimento, as operárias foram divididas da seguinte forma: 15 foram individualizadas em placas de Petri, com as restantes divididas em grupos de 5 operárias por placa. Suprimentos de água e alimento foram colocados nas placas e trocados a cada dois dias.

A mortalidade foi avaliada diariamente durante 10 dias.

2.4- Análise estatística

Os valores médios da taxa de encapsulação dos diferentes grupos foram comparados por ANOVA, adotando $\alpha = 5\%$.

As curvas de sobrevivência foram obtidas comparando múltiplas amostras pelo teste de Kaplan-Meier. As comparações entre os pares de grupos foram feitas através do teste não paramétrico Log-Rank. O nível de significância para ambos os casos foi 5%.

Todos os dados foram analisados no programa StatSoft Statistica 10 Enterprise.

3- RESULTADOS

3.1- Taxa de encapsulação sob efeito da azadiractina

Não houve diferença significativa na taxa de encapsulação das operárias de *A. sexdens* que receberam a solução de azadiractina, quando comparada à do grupo controle ($F_{1,398} = 0,271$; $n = 400$; $p = 0,603$) (Figura 1A). As operárias de *Ac. subterraneus subterraneus* que receberam o tratamento também não se comportaram diferentemente do grupo controle ($F_{1,398} = 0,961$; $n = 400$; $p = 0,328$) (Figura 1B). Avaliou-se também se existia diferença na taxa de encapsulação entre as espécies, porém ela também não se mostrou diferente ($F_{3,796} = 1,092$; $n = 800$; $p = 0,352$).

3.2- Mortalidade associada à imunidade social

Em *A. sexdens* a análise de mortalidade mostrou que houve diferença entre os tratamentos ($X^2 = 8,779$; G.L. = 3; $p = 0,032$) (Figura 2); porém, quando se comparou, no controle, as operárias mantidas solitárias com as mantidas em grupo, não houve diferença significativa na mortalidade ($p = 0,020$), o que também ocorreu com aquelas tratadas com a dieta ($p = 0,260$). A situação que diferiu significativamente foi a comparação entre o controle em grupo com o tratamento individual ($p = 0,011$).

Em *Ac. subterraneus subterraneus* a análise de mortalidade indicou que não houve diferença significativa entre os grupos ($X^2 = 5,235$; G.L. = 3; $p = 0,155$) (Figura 3), portanto não houve necessidade de comparações individuais entre os mesmos pelo teste de Log-Rank.

Comparando-se a taxa de mortalidade entre *A. sexdens* e *Ac. subterraneus subterraneus*, o teste indicou que houve diferença significativa entre as espécies ($X^2 = 66,973$; G.L. = 7; $p < 0,001$) (Figura 4). As comparações dos grupos semelhantes entre as espécies mostraram diferenças significativas em todos eles; controle individual ($p = 0,002$), controle grupo ($p < 0,001$), tratamento individual ($p < 0,001$) e tratamento grupo ($p < 0,0001$). Em todas as situações as operárias de *A. sexdens* apresentaram maior mortalidade que as operárias de *Ac. subterraneus subterraneus*.

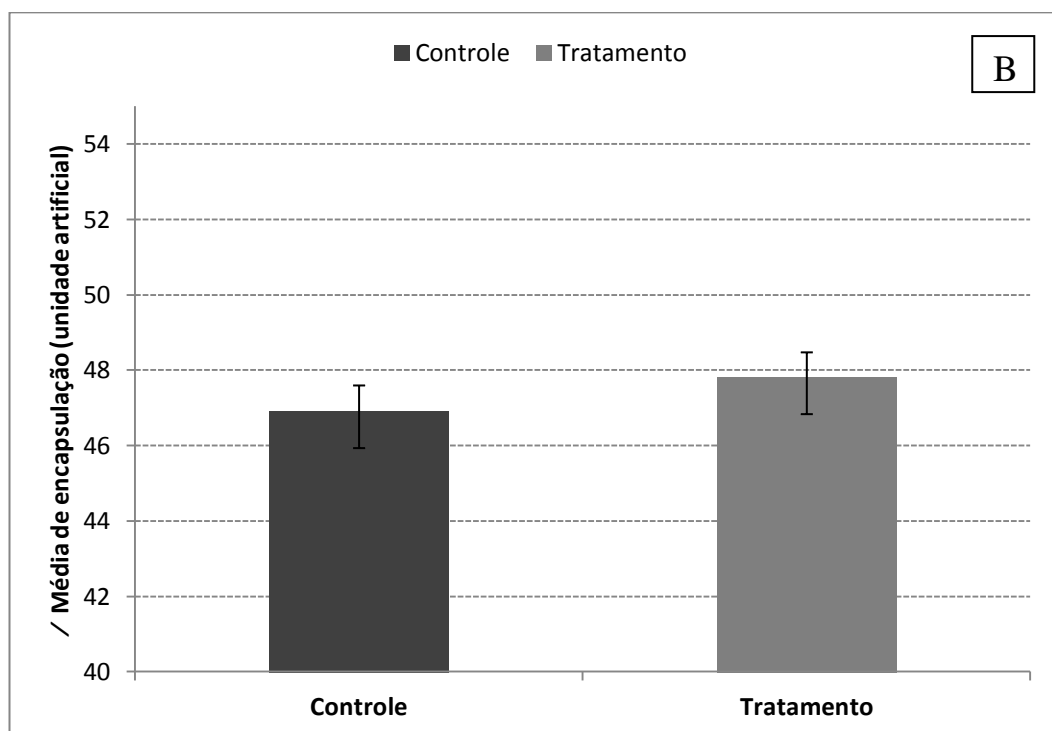
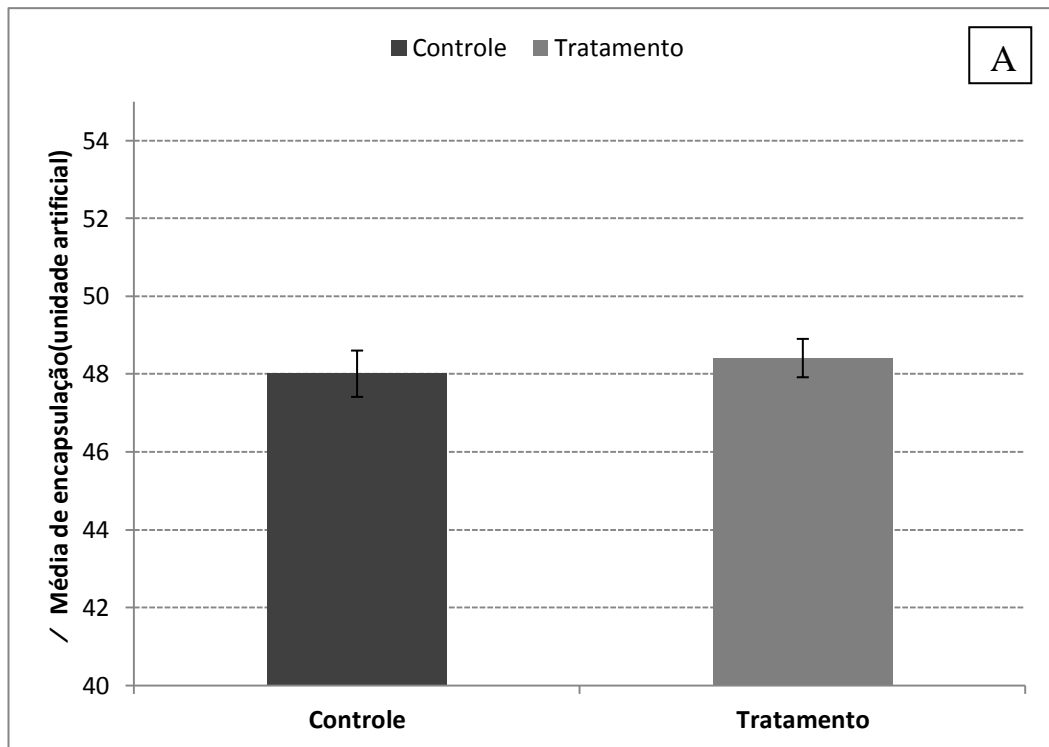


Figura 1- Porcentagem média de encapsulação das operárias de *Atta sexdens* (A) e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (B) após aplicação tópica de solução contendo azadiractina. Barras verticais representam o erro padrão. (ANOVA, adotando-se $\alpha = 5\%$)

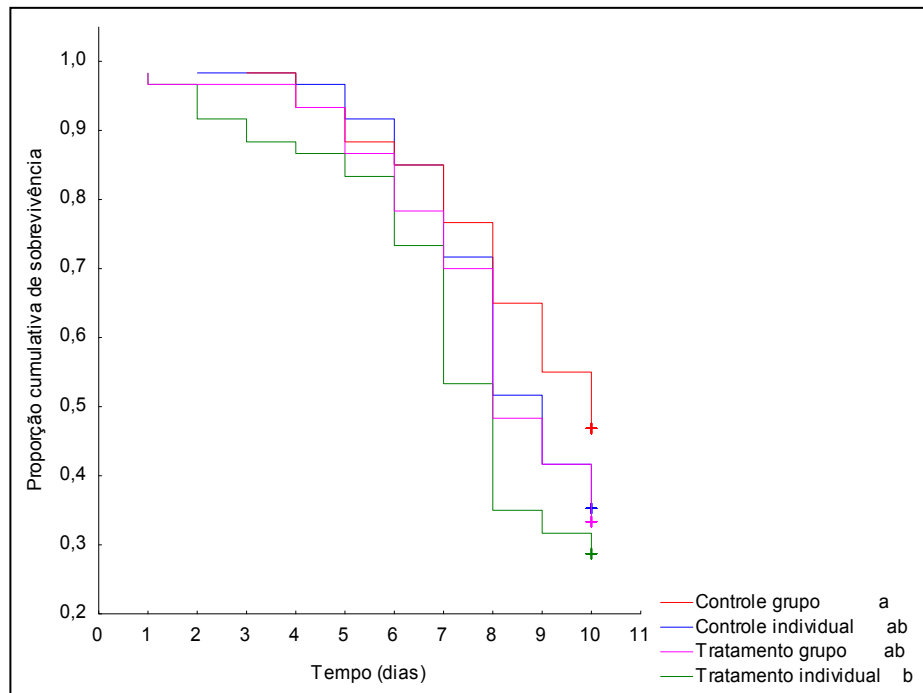


Figura 2- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Atta sexdens*, após oferecimento da dieta contendo azadiractina no decorrer dos dias entre os tratamentos (legendas seguidas de mesma letra indicam que não houve diferença significativa no teste de Log-Rank, a 5% de probabilidade)

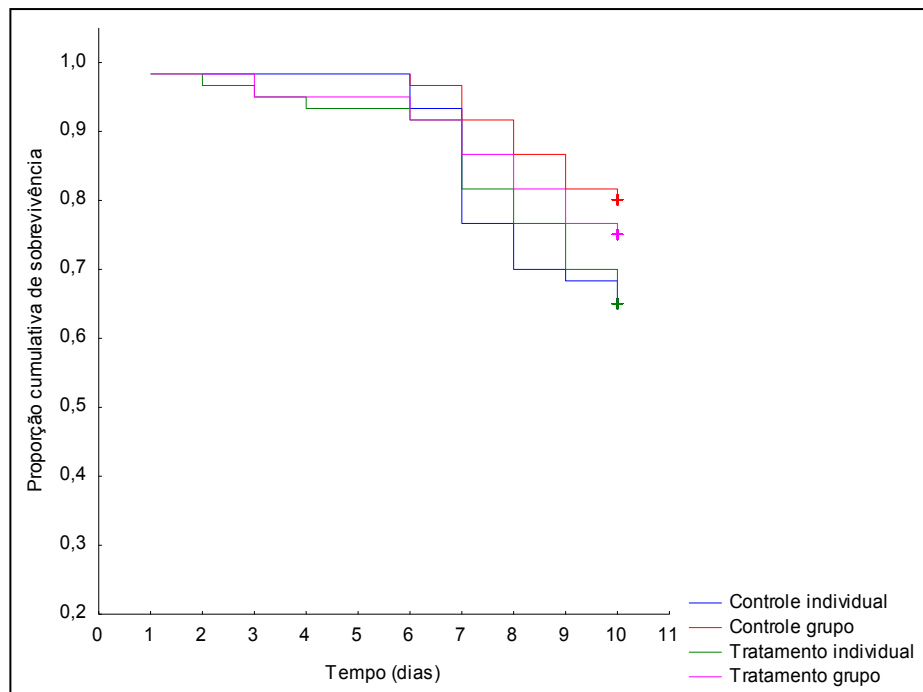


Figura 3- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, após oferecimento da dieta contendo azadiractina no decorrer dos dias entre os tratamentos (teste de Log-Rank, a 5% de probabilidade)

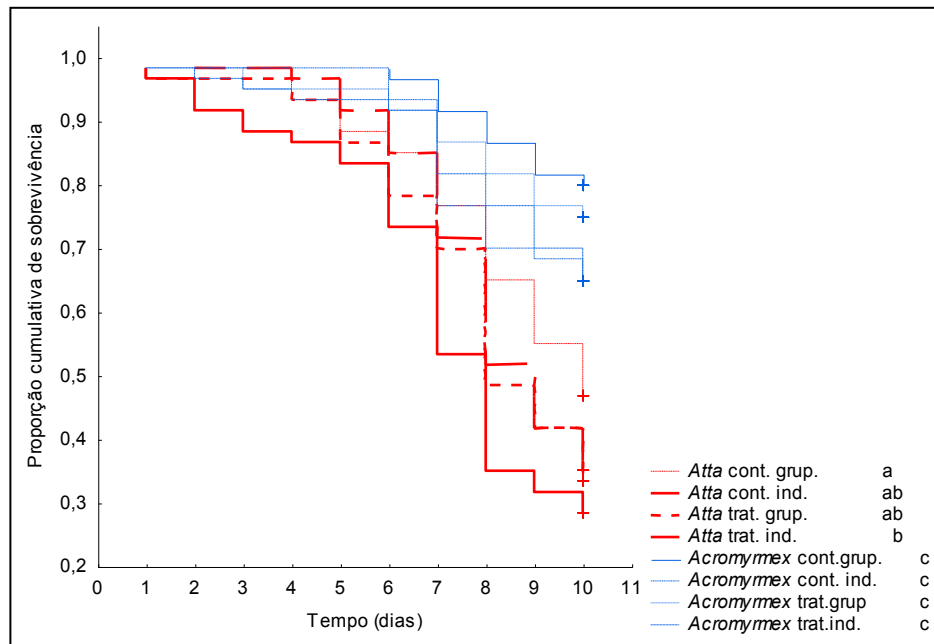


Figura 4- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *A. sexdens* e *Ac. subterraneus subterraneus* após oferecimento da dieta contendo azadiractina no decorrer dos dias entre os tratamentos (legendas seguidas de mesma letra indicam que não houve diferença significativa no teste de Log-Rank, a 5% de probabilidade)

4- DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que a azadiractina na dosagem e forma como foi aplicada não reduziu a taxa de encapsulação das operárias, bem como não houve diferença nas taxas entre as duas espécies analisadas.

Outros autores também já observaram que, após a inoculação de *Enterobacter cloacae* no corpo de larvas de quarto instar de *Rhodnius prolixus*, não houve diferença na ativação da enzima profenoxidase, responsável pelo processo de encapsulação, quando os organismos foram tratados ou não com dieta à base de azadiractina. Apesar de notarem os efeitos do composto em outros aspectos do sistema imune, como a diminuição no número de hemócitos e na formação de nódulos, na taxa de encapsulação a azadiractina não foi eficaz contra esses insetos, bem como observado contra as formigas-cortadeiras (Azambuja et al., 1991).

Igualmente, Singh et al (2013) observaram que o composto NeemAzal, assim como o Azamax, à base de óleo de Nim e cujo princípio ativo é a azadiractina, afetaram negativamente o sistema imune do gafanhoto *Poecilocus pictus*, injetado na concentração de 1mg/ml, reduzindo a formação de nódulos quando os insetos foram inoculados com bactérias.

Os resultados do presente trabalho indicam que na forma como foi inoculada nas formigas, a azadiractina não foi eficiente na redução da capacidade de encapsulação, porém seus efeitos em outros aspectos, como na formação de nódulos, não foram estudados. Sob aplicação de dosagens maiores, as operárias não sobreviveriam, portanto não foi possível testar se em doses maiores ocorreria inibição da resposta imune.

Com relação ao experimento de imunidade social, o oferecimento da dieta à base de azadiractina e posterior exposição ao patógeno *M. anisopliae* também não afetou a mortalidade das operárias das duas espécies estudadas. O fato de estarem em grupo também não favoreceu a sobrevivência das mesmas, o que contraria a evidência de que em grupo as operárias teriam possibilidade de realizar allogrooming, livrando-se, dessa forma, mais facilmente, do patógeno.

Embora o comportamento de allogrooming esteja associado à diminuição da disseminação de patógenos na colônia (Hughes et al., 2002), o que aumentaria a sobrevivência das operárias, Theis et al. (2015) observaram que ao serem expostas a um patógeno, as formigas da espécie *Lasius neglectus* aumentaram a frequência de autogrooming enquanto diminuíram simultaneamente a frequência de allogrooming.

Isso demonstrou que o efeito desse último comportamento depende do balanço entre a eficiência do patógeno e eficácia das defesas comportamentais coletivas.

Dessa forma, é possível que o fato de estar em grupo, nas condições do experimento, não tenha adicionado uma proteção às operárias e, portanto, não afetou a mortalidade das mesmas.

Observou-se também que, as operárias de *Ac. subterraneus subterraneus* tiveram mortalidade muito menor (cerca de 50%) que as de *A. sexdens*. As operárias de *Acromyrmex* apresentam bactérias filamentosas na cutícula que produzem substâncias antibióticas, configurando uma defesa extra contra os patógenos, o que pode ter favorecido a maior sobrevivência dessas operárias. Em *Atta* essas bactérias têm quantidades reduzidas ou estão ausentes. Fernández-Marín et al. (2009) demonstraram que, após exposição ao patógeno *M. anisopliae*, as operárias de *A. sexdens* aumentaram consideravelmente a liberação de compostos antibióticos pela glândula metapleurial. Já em *Acromyrmex octospinosus*, a liberação de compostos por essa glândula se manteve a mesma antes e após a exposição ao patógeno, o que indica que os compostos liberados pelas bactérias filamentosas as protegem eficientemente, não necessitando de um incremento na produção de compostos pela glândula metapleurial.

Conclui-se que a azadiractina não afeta a capacidade de reconhecimento e encapsulação de um patógeno pelas cortadeiras, bem como sua sobrevivência quando em grupo, não agindo, dessa forma, nesses aspectos da resposta imune dessas formigas.

5- REFERÊNCIAS

- Azambuja, P., E.S. Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Warthen Jr, J.D. 1991. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. *Journal of Insect Physiology*, **37**, p.771-777.
- Boeke, S. J.; Boersma, M. G.; Alink, G. M.; Van Loon, J. J. A.; Huis, A. V.; Dicke, M.; Rietjens, I. M. C. M. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**, p.25-41.
- Della Lucia, T. M. C.; Araújo, M. S. 2000. Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado – doenças, pragas e plantas daninhas**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, p. 245-273.
- Della Lucia, T.M.C. 2003. Hormigas de importância econômica em la región Neotropical. In: Fernández, F. (Ed.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, p. 337-349.
- Della Lucia, T. M. C.; Oliveira, M. A.; Araújo, M. S.; Vilela, E. F.1995. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. *Revista Árvore*, **19**, p. 92-99.
- De Souza, D.J., Bezier, A., Depoix, D., Drezen, J.M.. & Lenoir, A. 2009. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*. *BMC Microbiology*, **9**, 29.
- Fernández-Marín, H.; Zimmerman, J.K.; Nash, D.R.; Boomsma, J.J.; Wcislo, W.T. 2009. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, p. 2263-2269.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. & Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, **42**, p. 611-643.
- Hölldobler B., Wilson E.O. 1990. **The ants**. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 782 pp.
- Hubbell, S. P.; Wiemer, D. F. 1983. Host plant selection by an Attini ant. In: JAISSON, P. (Ed.). **Social Insects in the tropics**. Paris: University of Paris, v. 2, p. 133-154.
- Hughes, W. O. H.; Eilenberg, J.; Boomsma, J. J. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, **269**, p. 1811–1819.
- Hughes, W.O.; Thomsen, L.; Eilenberg, J. & Boomsma, J.J. 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a Neotropical forest, with

- particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**, p. 46-53.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, Stanford, **51**, p.45–66.
- Kay, A.D.; Bruning, A.J.; van Alst, A.; Abrahamson, T.T.; Hughes, W.O.H. & Kaspari M. 2014. A carbohydrate-rich diet increases social immunity in ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, p.
- Kogan, M. 1998. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*, **43**, p. 243–70.
- Lima, C.A. 2000. Atratividade de iscas e efeito da sazonalidade no forrageamento de *Atta bisphaerica* Forel, 1908. Dissertação de Mestrado em Entomologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 71 p.
- Martinez, S.S. 2002. **O nim** - *Azadirachta indica* - natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, IAPAR, 142pp.
- Ribeiro, M. M. R.; Amaral, K.D.; Seide, V.E.; Souza, B.M.R.; Della Lucia, T.M.C.; Kasuya, M.C.M.; De Souza, D.J. 2012. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche: A Journal of Entomology*, **2012**, p. 1–6.
- Santana, D. A. Q.; Couto, L.1990. Resistência intra-específica de eucaliptos a formigas-cortadeiras. *Boletim de Pesquisa Florestal*, **20**, p. 13-21.
- Schmutterer, H.1990. Properties and potential of natural pesticide from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, **35**, p. 271-297.
- Singh, A.P.; Jain, M.K.; Banerjee, S. 2013. Natural products modulate eicosanoid mediated nodulation in *Poecilocus pictus* Fab. (Acrididae, Orthoptera). *Proceedings of the National Academy of Sciences India, Sect. B. Biol. Sci*, **84**, p.75-82.
- Theis, F.J.; Ugelvig, L.V.; Marr, C.; Cremer, S. 2015. Opposing effects of allogrooming on disease transmission in ant societies. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, **370**, p. 1-10.
- Vendramin, J. D.; Silveira Neto, S.; Cerignoni, J. A. 1995. Não-preferência de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) por espécies de *Eucalyptus*. *Ecosistema*, **20**, p. 87-92.
- Zanetti, R.; Carvalho, G.A.; Santos, A.; Souza-Silva, A.; Godoy, M.S. 2002. **Manejo integrado de formigas cortadeiras**. Lavras: UFLA, 16p.

CAPÍTULO II

Efeito da azadiractina na mortalidade das operárias e na oviposição das rainhas

RESUMO

Os produtos químicos utilizados no controle das formigas-cortadeiras visam, geralmente, a morte das operárias forrageadoras com posterior morte da rainha e, conseqüentemente, da colônia, uma vez que ela é o único indivíduo que se reproduz. Porém, estudos que analisam o efeito de substâncias nas rainhas são escassos, principalmente no que diz respeito a efeitos indiretos como, por exemplo, na diminuição da oviposição. Sendo assim, objetivou-se neste capítulo avaliar a taxa de mortalidade das operárias de *Atta sexdens* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* sob aplicação tópica de diferentes concentrações de azadiractina, bem como o de analisar o efeito da aplicação tópica e de uma dieta contendo o produto na taxa de oviposição das rainhas das duas espécies. A aplicação tópica de azadiractina causou uma significativa mortalidade das operárias das duas espécies, que foi proporcional ao aumento da concentração da substância. O composto também reduziu a taxa de oviposição de rainhas de *A. sexdens*, tanto por meio de aplicação tópica quanto pelo oferecimento em dieta. Em *Ac. subterraneus subterraneus*, apenas a aplicação tópica afetou a oviposição das rainhas. Além disso, o tempo interferiu de forma positiva na taxa de postura de ovos apenas no controle de *A. sexdens*; nos demais grupos não se mostrou correlação entre o tempo e a postura, indicando que a metodologia do experimento não foi estressante para as rainhas. Conclui-se que a azadiractina afeta negativamente a sobrevivência das operárias e a oviposição das rainhas, mostrando-se um possível agente de controle das formigas-cortadeiras.

Azadirachtin and its effect on ant workers mortality and on the queen oviposition

ABSTRACT

The chemicals used in the control of leaf-cutting ants aim, usually, at the death of foraging workers with the subsequent death of the queen; as a consequence the entire colony dies, because the queen is the only one that reproduces. Yet, studies examining the effect of substances on queens are scarce, particularly in what regards their indirect effects as, for instance, in the reduction of oviposition. The purpose of this chapter is, then, the evaluation of mortality rates of workers of *Atta sexdens* and of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* after a topical application of azadirachtin in solutions of several concentrations, as well as the analysis of queens oviposition after topical application or ingestion of that chemical in a diet. The topical application of azadirachtin caused a significant rise in mortality of the workers of the two species, a rise that was proportional to the concentration employed. The compound also reduced the oviposition rate of the queens of *A. sexdens*, equally following topical use or as a supplement in the diet. *Ac. subterraneus subterraneus*, however, was only influenced in its egg-laying by a topical application of the chemical. Furthermore, time positively affected egg laying only in the control group of *A. sexdens*; the other groups showed no correlation between time and oviposition, thus indicating that the methodology of the experiment was not traumatic to the queens. It can then be concluded that azadirachtin negatively affects workers' survival and queen oviposition, being a promising future control agent of leaf-cutting ants.

1- INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras são responsáveis por danos econômicos em áreas agrícolas, pastagens e no setor florestal brasileiro (Della Lucia, 2003; Anjos et al., 1998; Zanetti et al., 2003). Nas áreas florestais, além dos prejuízos consideráveis, são responsáveis pela maior parte dos custos de produção de florestas (Boareto & Forti, 1997).

Os métodos de controle químico comumente empregados são os gases liquefeitos, os pós-secos, os líquidos termonebulizáveis e as iscas granuladas (Boareto & Forti, 1997; Oliveira et al., 2011), sendo estas últimas a base de fipronil, sulfluramida ou clorpirifós (Della Lucia & Araújo, 2000), configurando o método mais prático, econômico e eficiente (Della Lucia, 2003).

O desenvolvimento de uma isca granulada deve levar em consideração que a mesma necessita de características que a tornem mais eficiente, como princípios ativos que sejam letais em baixas concentrações, que sejam altamente atrativos e fáceis de serem dispersos, entre outras (Nagamoto et al., 1998). Portanto, estudos que visem analisar a taxa de mortalidade de operárias à substâncias potencialmente tóxicas são de grande importância, por oferecem suporte à criação de novos produtos de combate às cortadeiras.

Os produtos químicos mais utilizados no controle das formigas visam, num primeiro momento, a morte das operárias forrageadoras e a paralisação do corte. Posteriormente objetiva-se a morte da rainha e, conseqüentemente, da colônia, uma vez que ela é a única capaz de se reproduzir. Porém, estudos que analisam o efeito de substâncias agressivas às rainhas são escassos, principalmente no que diz respeito a efeitos indiretos, como por exemplo, na diminuição da oviposição.

Sendo assim, o objetivo neste capítulo é avaliar a taxa de mortalidade das operárias de *Atta sexdens* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* submetidas a aplicação tópica de diferentes concentrações de azadiractina, bem como analisar o efeito da aplicação tópica e dieta contendo esse produto na taxa de oviposição das rainhas das duas espécies.

Hipotetizou-se que a aplicação tópica de azadiractina aumentaria a mortalidade das operárias de ambas as espécies, e que esse aumento seria proporcional ao aumento da concentração da substância. Além disso, a taxa de oviposição das rainhas após serem submetidas à dieta ou aplicação tópica de azadiractina seria menor que no controle.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Mortalidade sob efeito da azadiractina

Utilizou-se uma solução do biopesticida à base de azadiractina (AZAMAX®) na concentração de 12g/L. Essa solução foi diluída em água destilada nas frações de 0,6mg/ml, 1,2mg/ml, 3,0mg/ml e 6mg/ml de azadiractina, de acordo com a metodologia de Ribeiro et al. (2008). Foram selecionadas 50 operárias forrageadoras (cápsula cefálica: 2,0-2,2mm) de cinco formigueiros de cada subespécie e para cada concentração, que receberam 1 µL da solução no tórax. Outras 50 operárias receberam 1µL contendo apenas água e funcionaram como controle.

Após esse procedimento inicial, 10 operárias foram colocadas por placa de Petri, com suprimento de água e alimento (água e mel, 1:1). A mortalidade foi avaliada diariamente durante oito dias.

2.2- Efeito da azadiractina na oviposição de rainhas

Foram selecionadas 15 rainhas de formigueiros jovens (6 meses; jardim de fungo de 100ml, aproximadamente) de cada subespécie.

Das rainhas selecionadas, cinco receberam solução de azadiractina na concentração de 1,2mg/ml no tórax. Respeitando-se a proporcionalidade de massa corporal, as rainhas de *A. sexdens* receberam 4 µL enquanto as de *Ac. subterraneus* subterraneus, 1 µL. Essas rainhas foram tratadas com uma dieta líquida contendo água e mel. Outras cinco rainhas foram tratadas com uma dieta líquida contendo a mesma concentração de azadiractina (1,2mg/ml), diluída em água e mel, a exposição a essa dieta foi crônica, portanto, durante todos os dias de teste, e não receberam nenhuma solução no tórax. E, por fim, as cinco rainhas restantes foram tratadas com uma dieta líquida a base de água e mel e tampouco receberam solução no tórax, funcionando como controle, de forma semelhante ao trabalho de Araújo et al. (1993). A concentração de 1,2mg/ml foi determinada tanto para a aplicação tópica quanto para a dieta, com base em teste de mortalidade, que indicou que essa foi a menor dosagem que causou diferença significativa em relação ao controle.

As rainhas foram individualizadas em potes plásticos e colocadas em ambiente com temperatura de 25±5 °C, U.R. de 75±5 % e iluminação reduzida. O número de ovos foi quantificado a cada 12 horas, num total de 96 horas de teste. A cada contagem, os ovos foram retirados dos recipientes, conforme a metodologia de Della Lucia et al. (1990).

2.3- Análise estatística

As curvas de sobrevivência foram obtidas comparando múltiplas amostras pelo teste de Kaplan-Meier. As comparações entre os pares de grupos foram feitas através do teste não paramétrico Log-Rank. O nível de significância para ambos os casos foi 5%.

Os valores médios da taxa de oviposição dos diferentes grupos foram comparados por ANOVA, seguidos da comparação de médias pelo teste de Tukey, adotando $\alpha = 5\%$.

Além disso, para o teste de oviposição realizou-se uma regressão linear simples a fim de verificar se houve efeito do tempo de experimento nos tratamentos.

Todos os dados foram analisados no programa StatSoft Statistica 10 Enterprise.

3- RESULTADOS

3.1- Efeito da azadiractina na mortalidade das operárias

Houve diferença significativa na mortalidade das operárias de *A. sexdens* entre as dosagens analisadas ($X^2= 128,278$; G.L= 4; $p<0,0001$) (Figura 5A). A única concentração que não diferiu do grupo controle foi a de 0,6mg/ml ($p= 0,603$). A mortalidade se mostrou diretamente proporcional à concentração e as comparações aos pares indicaram diferença entre todos os demais tratamentos e entre eles e o controle: controle e 1,2mg/ml ($p=0,043$), 0,6mg/ml e 1,2mg/ml ($p= 0,013$), 1,2mg/ml e 3,0mg/ml ($p< 0,0001$), 3,0mg/ml e 6,0mg/ml ($p= 0,005$).

Em *Ac. subterraneus subterraneus* também houve diferença significativa entre os grupos analisados ($X^2= 138,650$; G.L= 4; $p< 0,0001$) (Figura 5B). Semelhante à espécie anterior, o único grupo que não diferiu do controle foi o de concentração de 0,6mg/ml ($p= 0,302$). A mortalidade também se mostrou crescente com o aumento da concentração de azadiractina. As comparações entre os grupos indicaram diferenças em todos eles: controle e 1,2mg/ml ($p< 0,0001$), 0,6mg/ml e 1,2mg/ml ($p<0,0001$), 1,2mg/ml e 3,0mg/ml ($p< 0,0001$), 3,0mg/ml e 6,0mg/ml ($p= 0,002$).

3.2- Efeito da azadiractina na taxa de oviposição das rainhas

Em *A. sexdens* houve diferença significativa na taxa de oviposição das rainhas entre os grupos testados ($F_{2,117}= 11,067$; $p< 0,0001$) (Figura 6A). Por meio do teste de Tukey, observou-se que a taxa de oviposição do grupo que recebeu a dieta contendo azadiractina diferiu significativamente do controle ($p< 0,0001$), o que também ocorreu com o grupo que recebeu aplicação tópica de solução de azadiractina em relação ao controle ($p< 0,0001$). Além disso, ambos os tratamentos, dieta e aplicação tópica, não diferiram entre si ($p= 0,992$).

Em *Ac. subterraneus subterraneus* também houve diferença significativa entre as taxas de oviposição das rainhas nos grupos testados ($F_{2, 117}= 3,167$; $p= 0,045$) (Figura 6B). Pelo teste de Tukey observou-se que o grupo que recebeu aplicação tópica diferiu significativamente do controle ($p= 0,037$), o que não ocorreu com o grupo que recebeu a dieta em relação ao controle ($p= 0,259$). Os dois tratamentos, dieta e aplicação tópica, também não diferiram entre si ($p= 0,635$).

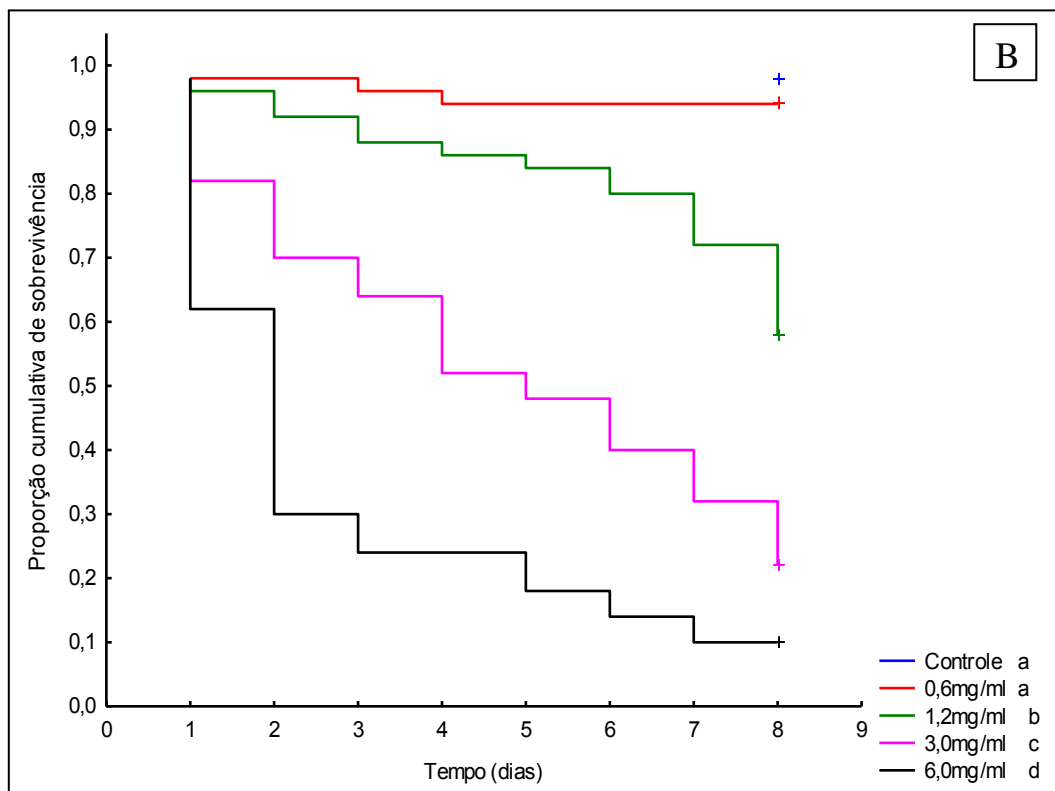
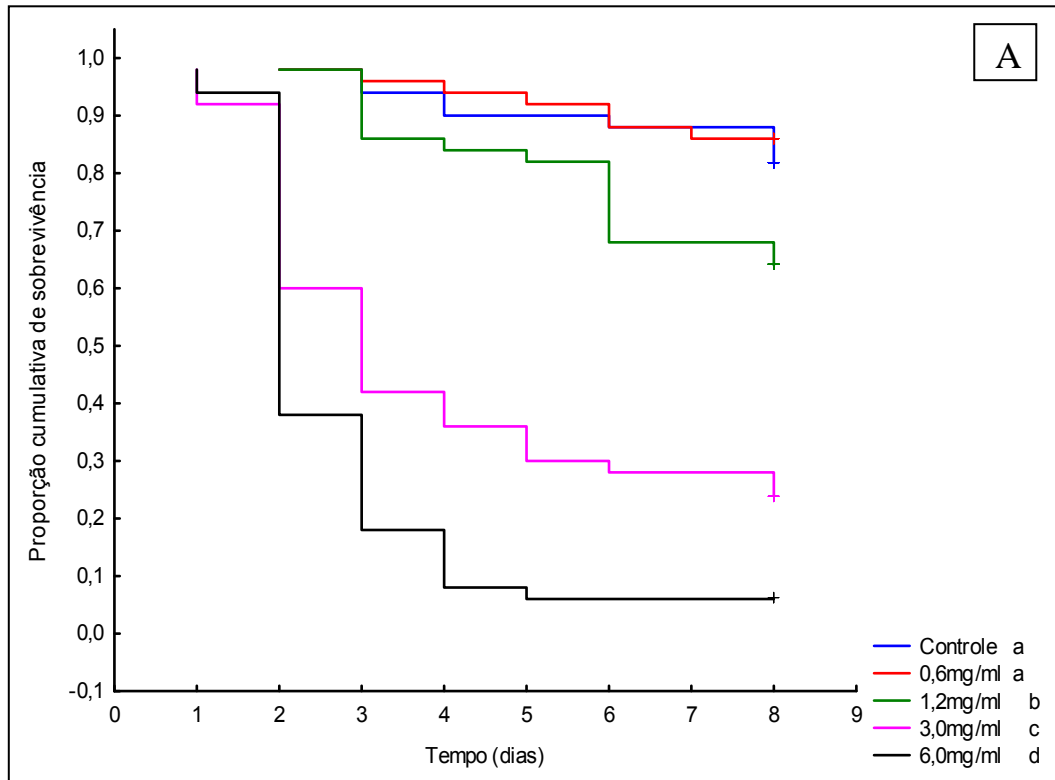


Figura 5- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Atta sexdens* (A) e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (B), após aplicação tópica de azadiractina no decorrer dos dias entre as concentrações (legendas seguidas de mesma letra indicam que não houve diferença significativa no teste de Log-Rank, a 5% de probabilidade)

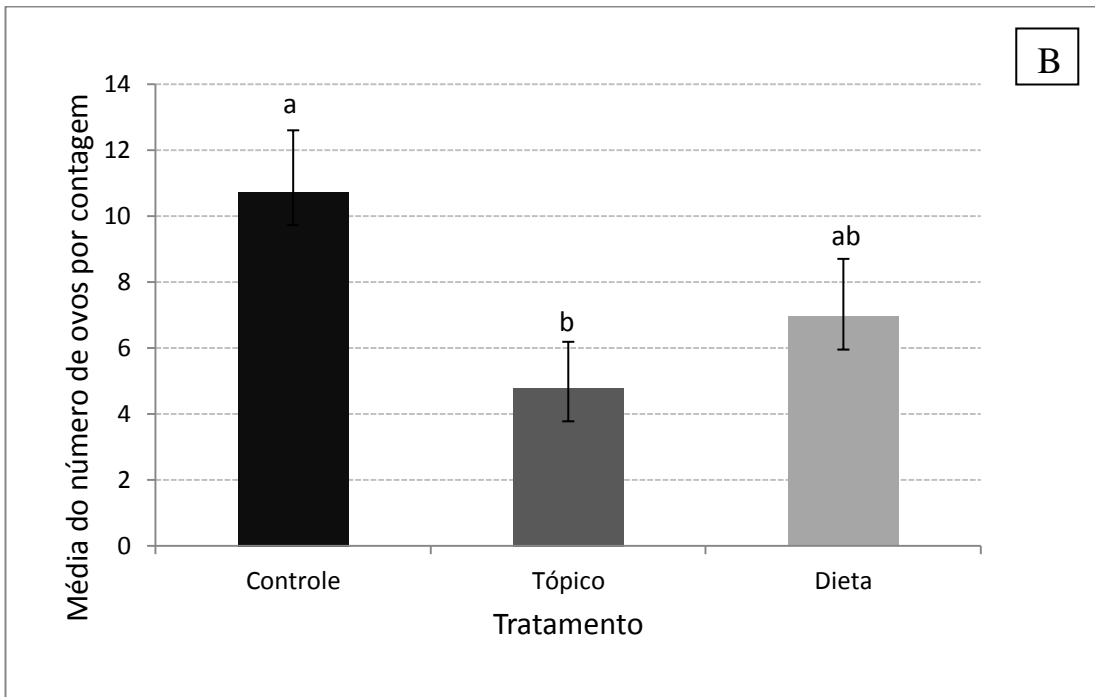
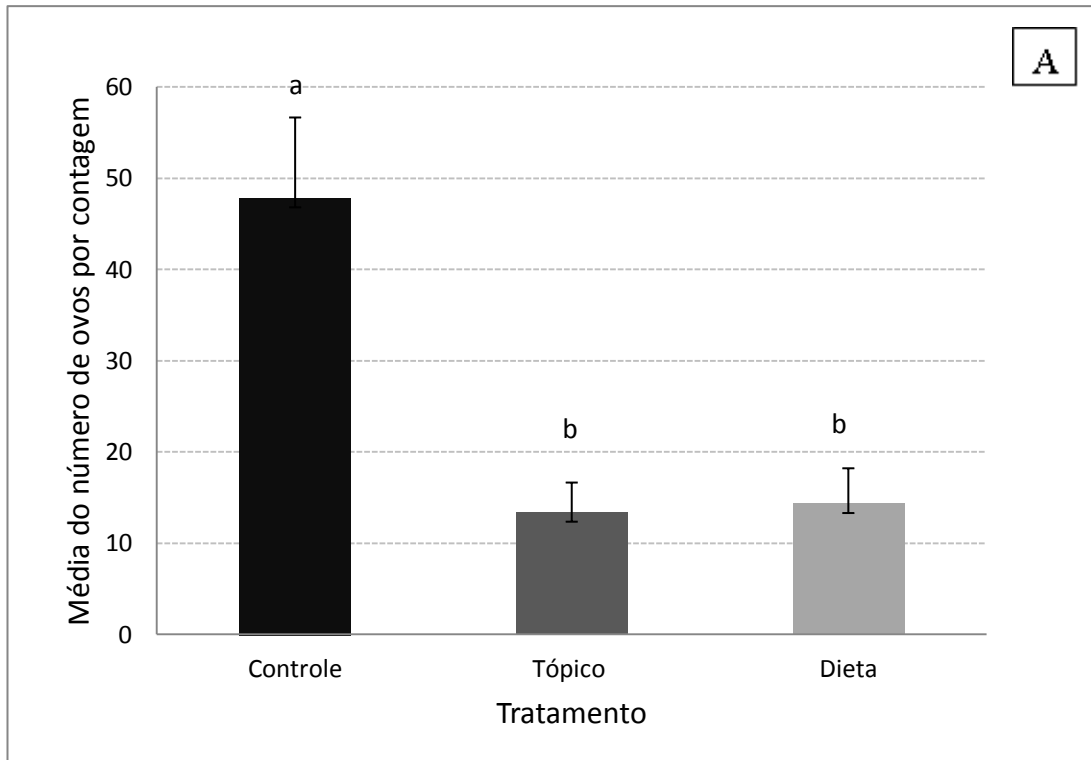


Figura 6: Média do número de ovos postos por rainhas de *Atta sexdens* (A) e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (B) por tratamento, a cada contagem (barras verticais indicam o desvio padrão da média e letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

Por meio da análise de regressão observou-se que em *A. sexdens*, o único grupo que sofreu efeito do tempo foi o controle (Figura 7A), que mostrou aumento da taxa de oviposição com o aumento das horas de experimento ($R^2= 0,103$; $F_{1,38}= 4,376$; $p= 0,043$), os demais grupos não variaram com tempo: dieta ($R^2= 0,028$; $F_{1,38}= 1,097$; $p= 0,301$) e aplicação tópica ($R^2= 0,023$; $F_{1,38}= 0,932$; $p= 0,340$).

Em *Ac. subterraneus subterraneus*, nenhum dos grupos testados sofreu efeito do tempo de experimento (Figura 7B), controle ($R^2= 0,037$; $F_{1,38}= 1,473$; $p= 0,232$), dieta ($R^2= 0,024$; $F_{1,38}= 0,942$; $p= 0,337$) e aplicação tópica ($R^2= 0,008$; $F_{1,38}= 0,326$; $p= 0,571$).

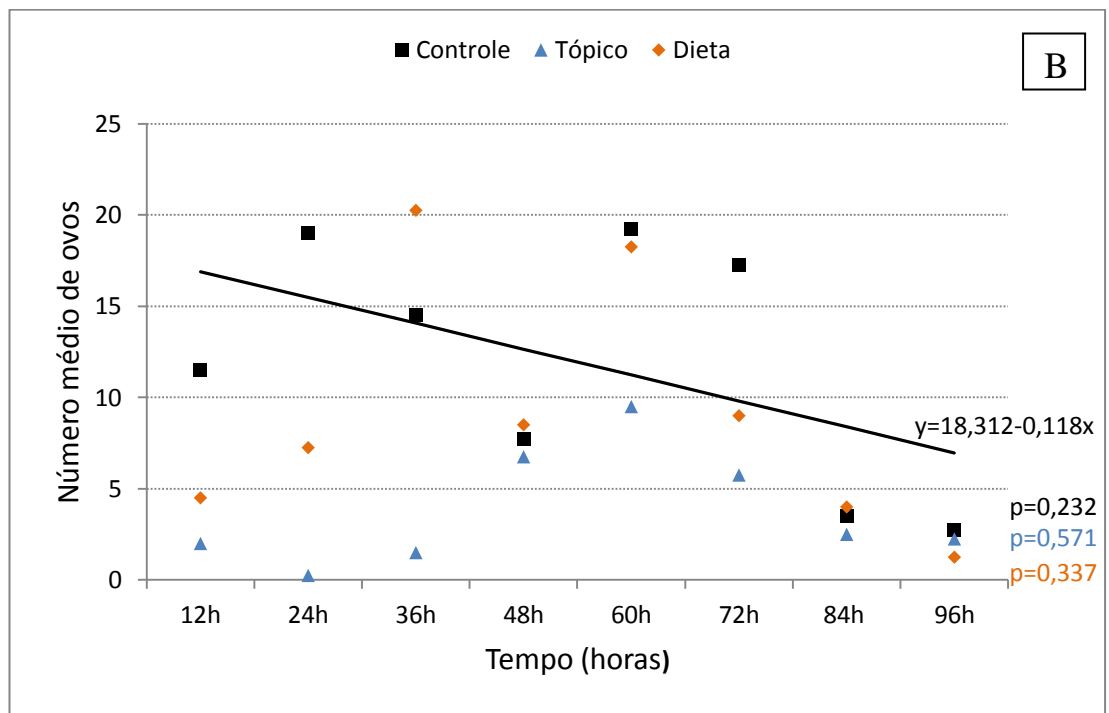
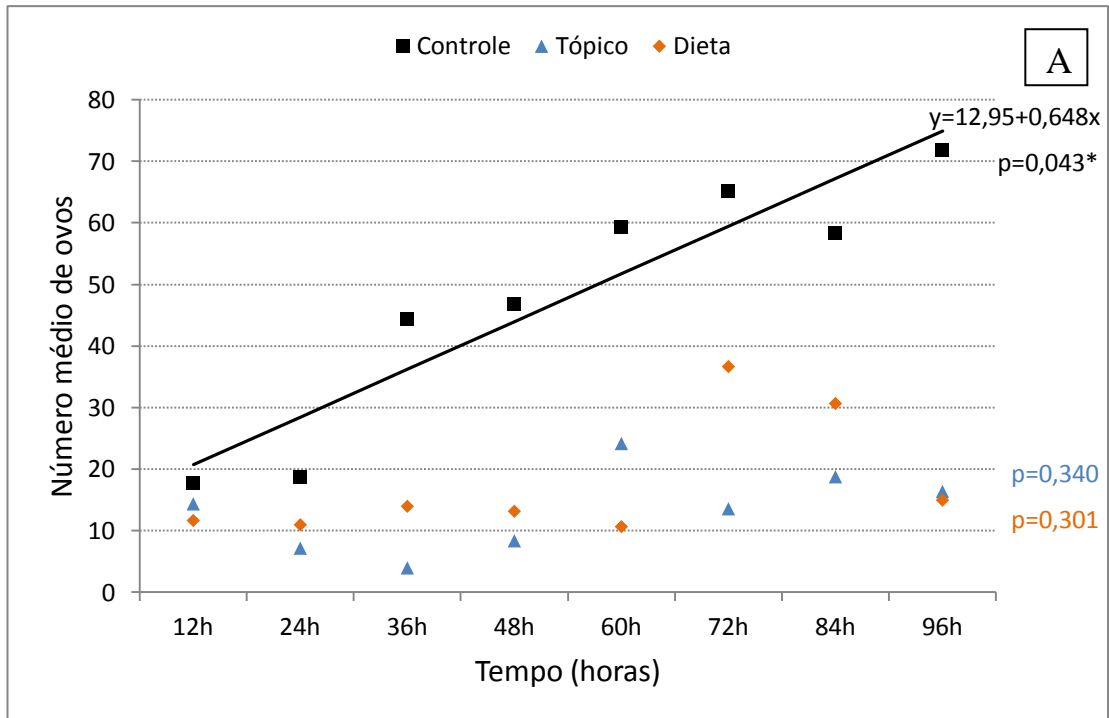


Figura 7: Número médio de ovos postos por rainhas de *Atta sexdens* (A) e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (B) no decorrer do tempo do experimento (*= modelo de regressão significativo a 5% de probabilidade pela análise de regressão simples)

4- DISCUSSÃO

A azadiractina causou efeitos letais às operárias de formigas-cortadeiras das espécies estudadas, resultados esperados, uma vez que, os efeitos dessa substância na mortalidade dos insetos já foram verificados em vários grupos-alvo, como, afídeos (Souza et al., 2015; Ebrahimi et al., 2013), cigarrinhas (Garcia et al., 2006) e ácaros (Bernardi et al., 2012). Nesse último, além dos efeitos letais, a azadiractina foi pouco tóxica aos inimigos naturais do ácaro, favorecendo a manutenção do controle biológico dessa praga.

A mortalidade das operárias das formigas, provavelmente, está associada à fago-inibição causada pela azadiractina em muitos insetos à semelhança do que já foi relatado em Isman (2006). Apesar de não terem sido testados em formigas, seus efeitos primários na estimulação das células de deterrência e inibição dos estimuladores alimentares, bem como seus efeitos secundários no bloqueio da síntese de enzimas digestivas, observados em diversos insetos (Blaney et al. 1990; Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000), possivelmente favoreceram o aumento da mortalidade das cortadeiras, pois na deficiência nutricional os insetos têm seu metabolismo comprometido e estão sujeitos a diversas injúrias.

Substâncias que causam letalidade em operárias de formigas-cortadeiras são possíveis agentes de controle desses insetos, pois a mortalidade das operárias forrageadoras implica na paralisação do corte foliar, interrompendo, de imediato, os danos causados por elas no cultivo de plantas.

A pesquisa da melhor forma de veiculação desse composto no controle das formigas-cortadeiras, no campo, é uma investigação promissora, para que se minimize os efeitos da substância em insetos-não-alvo ao passo que se potencialize seus efeitos no controle desses insetos.

A azadiractina também se mostrou muito eficiente na redução da oviposição das rainhas de formigas-cortadeiras. Em *Atta sexdens*, tanto a aplicação tópica quanto a dieta foram eficazes nesse aspecto. Em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* apenas a aplicação tópica se mostrou eficiente na redução da taxa de oviposição. Por outro lado, essa redução não deve ser atribuída a um possível estresse metodológico, pois o tempo de experimento só afetou as rainhas do grupo controle em *A. sexdens*, e de forma positiva, enquanto nos demais grupos a oviposição não se mostrou negativamente correlacionada ao tempo.

Em *A. sexdens*, os resultados significativos apresentados pelos dois tratamentos (dieta e aplicação tópica) não diferiram entre si, o que pode indicar que ambos têm ação semelhante no corpo da rainha. Após aplicação tópica ela provavelmente realiza grooming na tentativa de se limpar da substância; nesse processo acaba ingerindo-a da mesma forma que na dieta. Porém, em *Ac. subterraneus subterraneus* a dieta não teve efeito significativo, o que indica que nesse caso a substância pode ter sido evitada pelas rainhas, apesar da mesma ser diluída em solução atrativa, o que não ocorre na aplicação tópica.

Esse efeito negativo da azadiractina na oviposição dos insetos também já foi observado em *Mahanarva fimbriolata* (Garcia et al., 2006), causando redução de 75-80% na taxa de oviposição das fêmeas e deformações fisiológicas e morfológicas nos ovos. Resultados semelhantes já foram observados em duas espécies de *Lepidoptera* (*Sesamia calamistis* e *Eldana saccharina*). Em ambas, a azadiractina causou diminuição do número de ovos, sendo o efeito mais expressivo em *S. calamistis* (Bruce et al., 2004).

A ação da azadiractina na oviposição das rainhas de formigas-cortadeiras pode ser similar ao efeito negativo que essa substância causa no sistema reprodutivo de outros insetos. Em *Labidura riparia* (Dermaptera), a azadiractina afetou negativamente o trato reprodutivo das fêmeas, reduzindo drasticamente o desenvolvimento ovariano e o processo de vitelogênese, visto que a vitelogenina estava ausente tanto no corpo gorduroso quanto na hemolinfa (Sayah et al., 1996). Além disso, um trabalho que analisou o efeito dessa substância em *Chrysoperla cárnea* (Neuroptera) permitiu concluir que a vitelogenina na hemolinfa das fêmeas está fortemente correlacionada com o crescimento ovariano e que a azadiractina afeta o acúmulo dessas proteínas nos ovos, causando o efeito negativo na oviposição desses insetos (Medina et al., 2004).

Outro trabalho mostrou ainda que a azadiractina reduz drasticamente os níveis de ecdiesteróides ovarianos em *Labidura riparia*, após as fêmeas serem injetadas com o composto (Sayah et al., 1998). A inibição da síntese de ecdiesteróides, especialmente a ecdisona, ocasiona uma muda incompleta nos insetos imaturos e leva as fêmeas adultas à esterilidade (Isman, 2006).

A ação da azadiractina nesse aspecto reprodutivo das formigas-cortadeiras ressalta ainda mais a potencial utilização desse composto como agente controlador desses insetos. Substâncias que causam efeitos subletais nas rainhas, como a redução da

oviposição, causam impactos significativos na dinâmica do ninho, pois esses indivíduos são os únicos responsáveis pela reprodução na colônia.

Portanto, o efeito da azadiractina na sobrevivência das operárias aliado à redução na oviposição das rainhas das duas espécies de formigas-cortadeiras estudadas se mostra uma alternativa promissora para o controle desses insetos-praga.

5- REFERÊNCIAS

- Anjos, N.; Della Lucia, T.M.C.; Mahyé-Nunes, A.J. 1998. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos**. Ponte Nova, Graff Cor, 97p.
- Araujo, 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. *Revista Ceres*, **40**, p. 104-112.
- Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Bernardi, O.; Malausa, T.; Garcia, M.S.; Nava, D.E. 2013. Effects of azadirachtin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its compatibility with predatory mites (Acari: Phytoseiidae) on strawberry. *Pest Management Science*, **69**, p. 75-80.
- Blaney, W.M., M.S.J. Sommonds, W.V. Ley, J.C. Anderson & P.L. Toogood. 1990. Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **55**, p. 149-160.
- Boareto, M. A. C.; Forti, I. C. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, **11**, p. 31-46.
- Bruce, Y.A.; Gounou, S.; Chabi-Olaye, A.; Smith, H.; Schulthess, F. 2004. The effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) oil on oviposition, development and reproductive potentials of *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) and *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Agricultural and Forest Entomology*, **6**, p. 223–232
- Della Lucia, T. M. C.; Araújo, M. S. 2000. Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado – doenças, pragas e plantas daninhas**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, p. 245-273.
- Della Lucia, T.M.C. 2003. Hormigas de importância económica em la región Neotropical. In: Fernández, F. (Ed.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, p. 337-349.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Anjos, N & Moreira, D.D.O. 1993. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: Della Lucia, T.M.C. (ed) **As formigas cortadeiras**, p.151-162.
- 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: R. K. Vander Meer; K. Jaffé; A. Cedeno. (Org.). **Applied myrmecology, a world perspective**. 1 ed. San Francisco & Oxford: Westview Press, p. 173-179.
- Ebrahimi, M.; Safaralizade, M.H.; Valizadegan, O. 2013. Contact toxicity of *Azadirachta indica* (Adr. Juss.), *Eucalyptus camaldulensis* (Dehn.) and *Laurus nobilis* (L.) essential oils on mortality of cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover

- (Hem.: Aphididae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, **46**, p. 2153-2162.
- Garcia, J.F.; Grisoto, E.; Vendramim, J.D.; Botelho, P.S.M. 2006. Bioactivity of neem, *Azadirachta indica*, against spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. Journal of Economic Entomology, **99**, p-2010-2014.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology, **51**, p.45–66.
- 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. Journal of Economic Entomology, **97**, p. 43-50.
- Mordue (Luntz), A.J. & Nisbet, A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, **24**, p. 615-632.
- Nagamoto, N.S.; Forti, L.C.; Moreira, A.A.1998. Eficiência de iscas granuladas Mirex-S Max® e Mirex-S Plus® para o controle de *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta laevigata* e *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 17, 1998, Rio de Janeiro. Resumos Sociedade Brasileira de Entomologia, p.567.
- Oliveira. M.A.; Araújo, M.S.; Marinho, C.G.S.; Ribeiro, M.M.R. & Della Lucia, T.M.C.. 2011. Manejo de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C (ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**, p. 400-419.
- Ribeiro, M. M. R. ; Della Lucia, T. M. C. ; Bacci, L ; Moreira, M.D. ; Picanço, M. C. 2008. Effect of plant extracts on survival of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera:Formicidae). Sociobiology, **52**, p. 387-398.
- Sayah, F.; Fayet, C.; Idaomar, M.; Karlinsky, A. 1996. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect: Dermaptera). Tissue & Cell, **28**, p.741- 749.
- Sayah, F.; Idaomar, M.; Soranzo, L.; Karlinsky, A. 1998. Endocrine and neuroendocrine effects of azadirachtin in adult females of the earwig *Labidura riparia*. Tissue & Cell, **30**, p.86-94.
- Souza, C.R.; Sarmiento, R.A.; Venzon, M.; Santos, G.R.; Silveira, M.C.A.C.; Tschoeke, P.H. 2015. Lethal and sublethal effects of neem on *Aphis gossypii* and *Cycloneda sanguinea* in watermelon. Acta Scientiarum, **37**, p. 233-239.
- Zanetti, R.; Zanuncio, J.C.; Vilela, E.F.; Leite, H.G.; Jaffé, K.; Oliveira, A.C. 2003. Level of economic damage for leaf-cutting ants in Eucalyptus plantation in Brazil. Sociobiology, **42**, p. 433-442.

CONCLUSÕES GERAIS

A azadiractina aplicada topicamente não afetou a resposta imune individual das operárias das duas espécies estudadas, no que diz respeito à taxa de encapsulação. Além disso, agiu de forma semelhante em ambas.

O experimento de imunidade social mostrou que a dieta à base de azadiractina não afetou a mortalidade das operárias das duas espécies diante do patógeno *Metarhizium anisopliae*, bem como o fato de estarem em grupo não favoreceu a sobrevivência. Por outro lado, os resultados mostraram que *Ac. subterraneus* subterraneus apresentou mortalidade significativamente menor do que *A. sexdens*, o que provavelmente se deve ao fato de apresentarem bactérias filamentosas na cutícula, que configuram uma defesa adicional contra os patógenos.

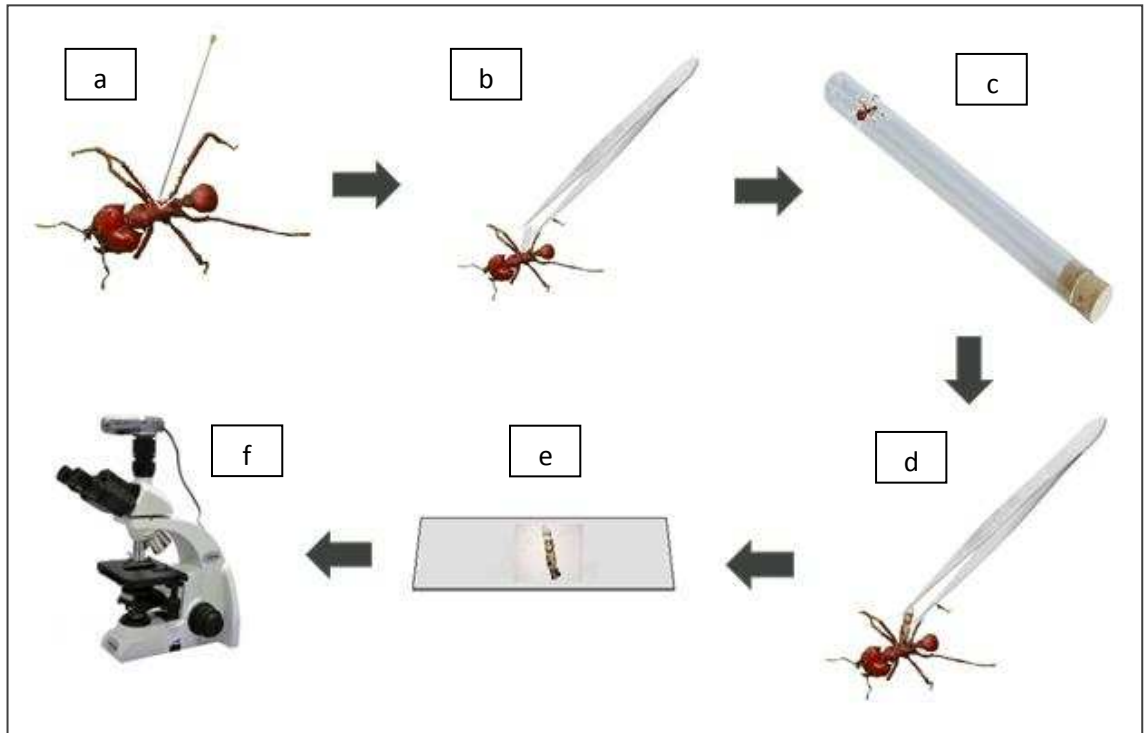
A aplicação tópica de azadiractina causou mortalidade significativa nas operárias das duas espécies, o que foi proporcional ao aumento da concentração da substância. Essa mortalidade deve estar associada ao efeito inibidor de apetite que a azadiractina possui, prejudicando o metabolismo das formigas e ocasionando sua morte.

A azadiractina também reduziu a taxa de oviposição de rainhas de *A. sexdens* tanto por meio de aplicação tópica quanto por oferecimento de dieta. Em *Ac. subterraneus* subterraneus apenas a aplicação tópica afetou a oviposição das rainhas. Além disso, o tempo de experimento interferiu de forma positiva na taxa de postura de ovos no controle de *A. sexdens*; nos demais grupos não se mostrou correlação entre o tempo e a postura, indicando que a redução no número de ovos não se deve a um estresse metodológico e sim aos efeitos do composto.

Esses resultados indicam que o efeito negativo que a azadiractina possui contra as cortadeiras não está associado à capacidade de encapsulação ou à suscetibilidade quando em grupo, mas sim, à sobrevivência das operárias e capacidade de oviposição das rainhas.

Esse trabalho oferece importantes subsídios na utilização de novos produtos para o controle de formigas-cortadeiras, uma vez que identificou, pela primeira vez, o efeito da azadiractina na mortalidade das operárias e oviposição das rainhas dessas formigas, duas importantes características requeridas por uma potencial substância de controle desses insetos-praga.

ANEXO



Anexo: Esquema simplificado do processo de encapsulação. (a) Abertura do orifício no tórax, (b) introdução do microfilamento de náilon, (c) individualização das operárias, (d) retirada do microfilamento, (e) montagem da lâmina, (f) fotomicrografia das lâminas