

ANDRESSA GRAEBIN

DISSULFETO DE DIFENILA E LIRAL EM COLÔNIAS DE *Atta sexdens*

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*.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes

Coorientadora: Karina Dias de Amaral

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

G734d
2022 Graebin, Andressa, 1992-
Dissulfeto de difenila e liral em colônias de *Atta sexdens* /
Andressa Graebin. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Entomologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 43-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.659>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Formiga-cortadeira - Controle. 2. Teste de toxicidade.
3. Relação inseto-planta. 4. Sobrevivência. I. Guedes, Raul
Narciso Carvalho, 1967-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em
Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.796

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

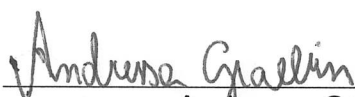
ANDRESSA GRAEBIN

DISSULFETO DE DIFENILA E LIRAL EM COLÔNIAS DE *Atta sexdens*

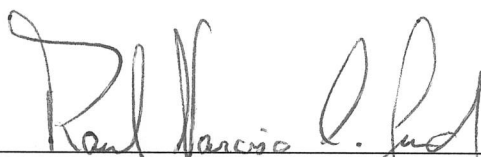
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de agosto de 2022.

Assentimento:



Andressa Graebin
Autora



Raul Narciso Carvalho Guedes
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, pela vida e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais Alcir e Almerinda, minha filha Bianca e meus irmãos André e Ana Paula por todo apoio e por nunca desistirem de mim e acreditarem na minha capacidade. Amo vocês e sou eternamente grata.

Agradeço aos meus amigos que a pós-graduação me proporcionou. Eldair, Alberico, Dayvson, Thayane, Weslei, Weslane, Carlos, Samuel e Ana Paula. Grata a cada um que me auxiliou nessa caminhada até aqui.

Aos meus amigos que a vida me deu. Jhonny, Kely, Silvana, Nubia, Luciana, Daniela, Ângela, Weverton, Geovane, Lindomar, Micahel, Weliton, Vanessa e Águeda, minha gratidão por toda amizade e companheirismo nessa etapa da minha vida.

Ao professor Raul pela orientação, amizade e por ser esse profissional exemplar. Aos membros da banca, Dra Karina, professora Terezinha e professor Marco pela disponibilidade e sugestões valiosas no desenvolvimento deste trabalho.

Deixo meus sinceros agradecimentos a Karina pois me ajudou muito nessa etapa de minha vida; uma grande profissional e amiga.

Aos amigos do Laboratório de formigas-cortadeiras. Karina, Lara, Luana, Leonardo, Josielle, Davi e Bruno, 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.

Agradeço ao Leonardo e Rodrigo pela ajuda com as análises estatísticas e por todo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. Por abrir as portas do conhecimento e permitir essa formação de excelência.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de estudar aos funcionários e professores pelo suporte durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), 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 minha filha Bianca, por ser minha
companheira, ser minha fonte de alegria e amor
incondicional”.*

Dedico

RESUMO

GRAEBIN, Andressa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Dissulfeto de difenila e liral em colônias de *Atta sexdens***. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadora: Karina Dias Amaral.

As formigas-cortadeiras são uma das principais pragas encontradas nas Américas, causando danos aos setores agrícola, florestal e de pastagens. As cortadeiras são de difícil controle, pois possuem diversas estratégias de defesa contra os patógenos e seleção dos vegetais que cortam, evitam determinadas plantas com compostos danosos à colônia ou a seu fungo simbiote. Atualmente, são utilizados a sulfluramida e o fipronil como ingredientes ativos para o controle das cortadeiras, porém, foram listados como “pesticidas altamente perigosos” pela Forest Stewardship Council (FSC). Assim, diversos estudos em andamento buscam novas moléculas com potencial de controle para esses insetos. Objetivou-se neste trabalho quantificar o efeito de diferentes concentrações das substâncias dissulfeto de difenila e liral no crescimento do fungo *L. gongylophorus*. E avaliar o efeito na aplicação tópica e dieta artificial na sobrevivência de operárias forrageadoras e jardineiras de *Atta sexdens*. Foi analisada a interação entre as operárias de *A. sexdens* por meio do algoritmo do programa Ethoflow para verificar quais castas estão disseminando os compostos em estudo por via tópica. Os compostos usados não tiveram efeito significativo ao *L. gongylophorus*; não alterando a massa e nem a área de crescimento do fungo. O oferecimento da dieta-artificial a ambas as castas não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle. A aplicação tópica dos dois compostos causou mortalidade significativa nas castas forrageadoras e jardineiras, reduzindo a sobrevivência com o aumento das concentrações dos compostos. Além disso, a interação entre castas forrageadoras tratadas e não tratadas foi maior com o dissulfeto de difenila. Diante do exposto, o composto dissulfeto de difenila apresentou características com potencial para o controle de formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: Toxicidade. Interação. Sobrevivência.

ABSTRACT

GRAEBIN, Andressa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Formicidal and fungicidal activity of diphenyl disulfide and lyral in colonies of *Atta sexdens***. Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisor: Karina Dias Amaral.

Leaf-cutting ants are one of the major pests found in the Americas causing damage to the agricultural, forestry and pasture sectors. The leaf-cutting ants are of hard control because they have several defense strategies against the pathogens and selection of the plants they cut, avoiding certain plants with compounds harmful to the colony or its symbiotic fungus. Currently, sulfluramid and fipronil are used as active ingredients for the control of leaf-cutting ants, but both compounds have been listed as “highly hazardous pesticides” by the Forest Stewardship Council (FSC). Thus, several ongoing studies are looking for new molecules with potential to control these insects. The objective of this work was to quantify the effect of different concentrations of diphenyl disulfide and lyral on the growth of the fungus *L. gongylophorus*. And to evaluate the effect of topical application and artificial diet on the survival of foragers and gardeners of *Atta sexdens*. It was analyzed the interaction between *A. sexdens* workers using the software Ethoflow to verify which castes are spreading the compounds under study topically. The used compounds had no significant effect on *L. gongylophorus*; not altering the weight nor the growth volume of the fungus was changed. The offering of the artificial diet to both castes showed no significant difference when compared to the control. The topical application of the two compounds caused significant mortality in foragers and gardeners, reducing their survival with the increasing concentrations of the compounds. Furthermore, the interaction between treated and untreated foragers was greater with diphenyl disulfide. In view of the above, the diphenyl disulfide compound presented characteristics with potential for the control of leaf-cutting ants.

Keywords: Toxicity. Behavior. Survival.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
1.1. Formigas-cortadeira	08
1.2. O fungo simbiótico <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	09
1.3. Interação entre castas	10
1.4. Chaguinha - <i>Tropaeolum majus</i> L.	11
1.5. Justificativa	12
1.6. Objetivos.....	12
1.7. Hipóteses.....	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. Isolamento e manutenção da cultura de fungo.....	14
2.2. Bioensaios de toxicidade ao fungo simbiote.....	14
2.3. Formigas utilizadas no bioensaio	15
2.4. Bioensaio de toxicidade em dieta	15
2.5. Bioensaio de toxicidade por via tópica às operárias de <i>Atta sexdens</i>	16
2.6. Avaliação das interações entre operárias forrageadoras e jardineiras	17
2.7. Análises estatísticas	19
3. RESULTADOS	19
3.1. Toxicidade ao fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	19
3.2. Toxicidade às operárias.....	23
3.3. Interações entre operárias forrageadoras e jardineiras	33
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1- Formigas-cortadeiras

As formigas, desde o Cretáceo, se diversificaram no ambiente terrestre, estando presentes em praticamente todo o planeta, com exceção dos polos (BRANDÃO *et al.*, 2011; DIEHL, 2017). Dentre essas, as formigas-cortadeiras pertencentes aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) estão entre as principais pragas encontradas nas Américas (ZANETTI *et al.*, 2003b; DELLA LUCIA, 2011). No Brasil, essas formigas geram perdas significativas, particularmente em plantações florestais causando o desfolhamento de plantas (DELLA LUCIA & MOREIRA, 1993). As formigas forrageadoras cortam, coletam e carregam fragmentos de plantas para o ninho, onde cultivam o fungo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus*, a principal fonte de alimento das larvas (CHERRETT, 1989). Os fungos se beneficiam do substrato, ambiente adequado e proteção fornecidos pelas formigas (SANTOS & CAZETTA, 2016; GULLAN & CRANSTON, 2017).

As formigas-cortadeiras são importantes pragas nos setores agrícola e de pastagens, provocando enormes danos econômicos (GARCIA *et al.*, 2003; WIRTH *et al.*, 2002). Além desses, cabe destaque para o setor florestal brasileiro, contexto em que formigas-cortadeiras danificam árvores jovens de *Eucalyptus* e podem reduzir a altura em até 32%, circunferência em até 25% e comprometer em até 60% a produção de madeira (DELLA LUCIA, 1993). Resultam em perdas diretas e indiretas, como morte de mudas, redução do crescimento das árvores, afetando também a resistência das árvores a insetos e patógenos (ZANETTI *et al.*, 2002).

No Brasil, as formigas-cortadeiras causam um prejuízo econômico de cerca de 70 milhões de reais anualmente (MELO *et al.*, 2020). As espécies de formigas-cortadeiras possuem ampla distribuição geográfica, com atividade durante todo o ano, atuando sobre muitas espécies vegetais (DELLA LUCIA, 1993). Dentre as formigas-cortadeiras, o gênero *Atta* (Myrmicinae: Attini) é destaque e conta com nove espécies presentes no Brasil (BACCARO *et al.*, 2015). Dentre elas, a espécie *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) é uma das mais importantes como praga, principalmente em locais de grandes extensões de monoculturas e florestas plantadas de eucaliptos (DELLA LUCIA *et al.*, 2014). *Atta sexdens* tem ocorrência ampla no país, estando ausente

somente na caatinga, em grande parte do Paraná, no litoral de Santa Catarina e em parte do Nordeste e do Rio Grande do Sul (DELLA LUCIA *et al.*, 2000). Essa formiga é conhecida como saúva-limão e demonstra uma capacidade de adaptação a diversos ambientes.

1.2- O fungo simbiótico - *Leucoagaricus gongylophorus*

O mutualismo entre as formigas-cortadeiras e o fungo simbiótico é muito antigo e bem evoluído. As Attini cultivam o fungo simbiótico há mais de 50 milhões de anos; esse fungo serve de alimento para a colônia (MUELLER *et al.*, 1998). Essa relação simbiótica é considerada como mutualismo, na qual os membros envolvidos se beneficiam mutuamente (RICKLEFS, 2003). A interação entre formigas-cortadeiras e o fungo está em constante evolução, chegando a um nível tão complexo que eles não podem mais sobreviver separadamente (MOREIRA *et al.*, 2011). Elas são os únicos insetos que cultivam fungos basidiomicetos da espécie *Leucoagaricus gongylophorus*.

A tarefa de incorporar pequenos fragmentos de materiais vegetais no fungo é feita pelas formigas de menor tamanho, as “operárias mínimas” (= jardineiras); já as operárias intermediárias (= forrageadoras) ficam responsáveis por fazer o corte e o transporte dos itens vegetais para o ninho, enquanto as “operárias máximas” (= soldados) defendem a colônia contra intrusos e competidores, além de forragearem (WILSON, 1980). As formigas-cortadeiras constroem e cultivam seus fungos em jardins protegidos, sendo também o local que acomoda a prole.

O fungo depende das formigas para selecionar o recurso vegetal, recortando o material em fragmentos menores, raspando para remover ceras e microrganismos invasores e têm suas bordas pregueadas e mastigadas antes de ser incorporado ao jardim fúngico (MOREIRA *et al.*, 2011). As formigas, após incorporarem o material no topo do jardim fúngico, depositam tufo de micélio fúngico e defecam com excremento contendo enzimas que degradam a biomassa vegetal (HENRIK *et al.*, 2013; AYLWARD *et al.*, 2015). Essas enzimas nos materiais vegetais facilitam a penetração do fungo, propiciando seu crescimento.

Essa associação e cuidados permitem às formigas-cortadeiras acessarem nutrientes na biomassa vegetal que de outra forma não estariam disponíveis (AYLWARD *et al.*, 2013; SUEN *et al.*, 2011). O fungo metaboliza o material vegetal,

até mesmo substâncias tóxicas, e à proporção que cresce, serve de alimento para a colônia, principalmente para os imaturos (larvas) (ERTHAL, 2004). Esse alimento contém reservas nutritivas, que são sugadas pelas formigas nas pontas das hifas, sendo ricas em glicogênio, em estruturas conhecidas como gongilídios (SCHULTZ & BRADY, 2008; AYLWARD *et al.*, 2013). Assim, esse mutualismo é uma fonte de energia para o fungo e fornece nutrientes para as formigas-cortadeiras.

O tecido dos fungos cultivados apresenta em média 24% de proteína bruta, 2% de carboidratos e 27% de lipídios (MUELLER *et al.*, 2001). Contudo, as formigas adultas consomem apenas 9% do fungo mutualista: a maior parte de sua alimentação é obtida por meio da ingestão de seivas vegetais (MUELLER, 2002).

Diversos outros microrganismos têm sido descritos em colônias de formigas-cortadeiras como simbiossiontes, além do fungo mutualista. Um complexo de bactérias filamentosas, incluindo as espécies do gênero *Pseudonocardia*, que cresce em locais específicos do exoesqueleto, tem como função inibir os fungos parasitas através de sua atividade antifúngica (CURRIE *et al.*, 1999; HOLMES *et al.*, 2016; MARSH *et al.*, 2013). As espécies *Burkholderia* estão também envolvidas com a defesa da colônia contra ataques de parasitas (SANTOS *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2011). Os parasitas encontrados nas colônias são fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycetes), e a levedura preta (*black yeast*) *Phialophora* (Ascomycota), que cresce na mesma região da cutícula das formigas onde se localiza a bactéria *Pseudonocardia* (LITTLE & CURRIE, 2007). Portanto, essas formigas-cortadeiras produzem bactérias antifúngicas para proteger o fungo simbiótico de fungos patogênicos e pesticidas (BLATRIX *et al.*, 2012).

1.3- Interação entre castas

A colônia de insetos sociais funciona como uma complexa rede social integrada, onde cada indivíduo desempenha uma função coletiva mantendo a estabilidade ambiental do ninho e a diversidade de comunicação demonstra que os indivíduos são regulados por comportamentos coordenados (WALTERS & FEWELL, 2012). As castas de uma colônia são unidades cooperativas fundamentais para a manutenção da mesma (DETRAIN & DENEUBOURG, 2006).

As redes sociais representam as relações entre organismos, que são

determinadas pelas funções que podem desempenhar na colônia, se ocorre interação com a rainha, forrageadores ou outras castas da sociedade (MERSCH, 2016). Formigas são insetos eussociais que compartilham comportamentos semelhantes como sobreposição de gerações, cuidados com a prole e divisão de castas (DELLA LUCIA *et al.*, 2014). As diferentes distribuições dentro de grupos sociais possibilitam vantagens e peculiaridades, permitindo analisar informações sobre transmissão de doenças, escolha de parceiros, competição e sucesso reprodutivos (APLIN *et al.*, 2015).

Em análise de redes sociais, os organismos são entendidos como nós interligados entre bordas; em contexto epidemiológico, isso pode representar um caminho para transmissão de patógenos para o grupo (GODFREY, 2013; GODFREY *et al.*, 2009). Os modelos são importantes pois analisam a estrutura social e podem mostrar os caminhos potenciais para transmissão e contaminação de agentes prejudiciais para a população (GODFREY *et al.*, 2010). A análise de redes sociais é importante para a compreensão da sociabilidade animal e fatores responsáveis pela construção dessas estruturas, a partir da quantificação da relação entre os organismos que compõem determinado grupo (JEANSON, 2012).

1.4- Chaguinha - *Tropaeolum majus* L.

Os inseticidas, mesmo sendo eficientes e com efeito rápido no combate às cortadeiras, afetam o ambiente, impulsionando a busca por compostos menos agressivos como por exemplo, os extratos de plantas inseticidas (BUENO & BUENO, 2011). A necessidade de novos métodos de controle devido a proibição de alguns inseticidas levou os pesquisadores a avaliar a atividade biológica de compostos originados do que temos com abundância na natureza, as plantas.

A investigação de moléculas fitoquímicas é frequentemente relatada como promissora para o controle de pragas agrícolas (TURCHEN *et al.*, 2020). Uma espécie vegetal com efeito deterrente e/ou repelente às formigas-cortadeiras pode possuir alguma característica nociva às colônias. A rejeição da planta pelo inseto pode estar ligada à presença de metabólitos secundários resultantes de um longo processo evolutivo na interação entre plantas e herbívoros (ARENAS & ROCES, 2016). Essa atividade tóxica pode ser atribuída à ação isolada de uma substância,

geralmente a majoritária, e/ou ao efeito sinérgico dos constituintes presentes nas plantas (KEREBBA *et al.*, 2019; LENGAI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a espécie *Tropaeolum majus*, conhecida popularmente como chaguinha, apresenta diversos metabólitos secundários. Alguns metabólitos encontrados nesta planta apresentam atividade antimicrobiana, tais como, isotiocianato de benzila e o ácido erúico (ZANETTI *et al.*, 2003a). Seus extratos e subfrações também apresentaram toxicidade ao jardim de fungo das formigas (RIBEIRO, 2011). A identificação do efeito fungicida de extratos etanólico e hexânico de *Tropaeolum majus* em *L. gongylophorus* apontaram as substâncias liral e dissulfeto de difenila como algumas possíveis responsáveis pelo efeito tóxico dos extratos dessa espécie vegetal (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Além disso, quando forrageada por formigas-cortadeiras, chaguinha apresentou atividade tóxica às operárias e causou alterações no comportamento de colônias (GANDRA *et al.*, 2016). No entanto, poucos são os estudos que investigam seus efeitos como possível agente controlador das formigas-cortadeiras.

1.5- Justificativa

O controle de formigas-cortadeiras é um dos problemas com grande demanda entre agricultores brasileiros. Dentre os agentes de controle de formigas-cortadeiras, os inseticidas, principalmente incorporados a iscas, são as opções mais utilizadas por serem práticas e econômicas. Além disso, a pressão para o fornecimento de novos produtos agrícolas e florestais sob técnicas menos agressivas ao meio ambiente é cada vez maior. Em 2015, a sulfluramida e o fipronil foram considerados como pesticidas "altamente perigosos" pela certificadora FSC (Forest Stewardship Council) (ZANUNCIO *et al.*, 2016; LAZZARI *et al.*, 2019). Assim, busca-se novos princípios ativos que combinam uma alta atratividade à uma toxicidade seletiva para colônias de *A. sexdens*. Idealmente seria interessante que o produto afetasse rapidamente a jardineira, o fungo simbiote e a rainha, mas com baixa toxicidade para forrageadoras para que ocorra a disseminação do produto no interior do ninho.

1.6- Objetivos

Visando o desenvolvimento de novas alternativas para o controle de formigas-cortadeiras, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade do dissulfeto de difenila e do liral para as operárias e para o fungo simbiótico *L. gongylophorus* de *A. sexdens* e a interação entre operárias forrageadoras e jardineiras.

Os objetivos específicos foram:

1. Quantificar o efeito da aplicação tópica de diferentes concentrações das referidas substâncias na sobrevivência de operárias jardineiras e forrageadoras de *A. sexdens*; quantificar o efeito de diferentes concentrações das substâncias liral e dissulfeto de difenila no crescimento do fungo *L. gongylophorus*;
2. Quantificar o efeito das substâncias dissulfeto de difenila e liral oferecidas em dieta líquida para avaliar a toxicidade e avaliar o efeito das substâncias nas redes de interação entre as castas de operárias forrageadoras e jardineiras.

1.7- Hipóteses

H₀: Não há diferença no crescimento do fungo *L. gongylophorus* com o aumento das concentrações de dissulfeto de difenila e liral.

H₁: Há diferença no crescimento do fungo *L. gongylophorus* com o aumento das concentrações de dissulfeto de difenila e liral.

H₀: Não há diferença na sobrevivência de operárias forrageadoras e jardineiras de *A. sexdens* com o aumento das concentrações de dissulfeto de difenila e liral pela aplicação tópica.

H₁: Há diferença na sobrevivência de operárias forrageadoras e jardineiras de *A. sexdens* com o aumento das concentrações de dissulfeto de difenila e liral pela aplicação tópica.

H₀: Não há diferença na sobrevivência de operárias forrageadoras e jardineiras de *A. sexdens* com o aumento das concentrações de dissulfeto de difenila e liral pelo oferecimento de dieta-artificial.

H₁: Há diferença na sobrevivência de operárias forrageadoras e jardineiras de *A. sexdens* com o aumento das concentrações de dissulfeto de difenila e liral pelo oferecimento de dieta-artificial.

H₀: Não há diferença na interação entre as castas e tratamentos de operárias *A. sexdens* quando aplicado dissulfeto de difenila e liral por via tópica.

H₁: Há diferença na interação entre as castas e tratamentos de operárias *A. sexdens* quando aplicado dissulfeto de difenila e liral por via tópica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento e manutenção da cultura de fungo

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* foi isolado de colônias de *Atta sexdens* coletadas do campo em áreas próximas ao local de estudo e mantidos no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, seguindo a metodologia proposta por Della Lucia *et al.*, (1993). Fragmentos de micélio deste fungo foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura preparado à base de peptona, cloreto de sódio, extrato de malte, glicose, aveia em flocos, ágar e água destilada. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 120°C, 1,1 atm por 30 minutos (PAGNOCCA *et al.*, 1990).

As placas contendo fungo foram mantidas por um mês em incubadora B.O. Da 25 ± 2 °C e umidade de 70%. Para a manutenção da cultura do fungo, “plugs” das culturas isoladas (fragmentos do fungo), de 1 cm de diâmetro, foram individualmente transferidos para novas placas com intuito de evitar contaminação e proliferar a cultura.

2.2 Bioensaios de toxicidade ao fungo simbiote

Para a realização dos bioensaios utilizou-se o liral e o dissulfeto de difenila, que foram obtidos pela Sigma-Aldrich® em estado líquido em embalagens de 10mg

(Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Este bioensaio teve como objetivo identificar e quantificar a toxicidade das substâncias liral e dissulfeto de difenila para o fungo *L. gongylophorus*. As substâncias foram solubilizadas em acetona (GANDRA, 2016). A solução de 100 µL foi acrescentada ao meio de cultura (PAGNOCCA *et al.*, 1990), nas concentrações de (0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/ml).

As devidas concentrações foram aplicadas com o auxílio de pipeta graduada em placa de Petri sobre meio de cultura contendo o antibiótico rifampicina (100 µL de antibiótico a cada 100 ml de meio) para evitar contaminação. O volume foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski de forma que ficasse o mais uniforme possível.

Após esse processo, um “plug” de fungo de 1 cm de diâmetro foi colocado em cada placa contendo 10 ml de meio tratado e essas foram vedadas com filme plástico de PVC e parafilme. O bioensaio foi composto por 10 tratamentos (quatro concentrações de cada uma das duas substâncias e dois controles, sendo um controle com água e o outro com acetona devido os tratamentos serem solubilizados em acetona) com 10 repetições cada.

Os tratamentos foram mantidos em incubadora B.O.D. ($25\pm 2^\circ\text{C}$) por um mês para a avaliação do crescimento. Após esse tempo, o micélio do fungo foi retirado, colocado em copos de papel alumínio e em seguida levados à estufa, a temperatura de 28°C , por 3 dias até a estabilização do peso seco. Todos os micélios foram pesados para a comparação entre os tratamentos. Além disso, a área total de crescimento do fungo foi medida com o auxílio do Software Image J.

2.3 Formigas utilizadas no bioensaio

As operárias de *A. sexdens*, com cápsula cefálica variando entre 2,0 a 2,2 mme 0,8 a 1,0 mm foram coletadas de formigueiros do Insetário da Universidade Federal de Viçosa. Os formigueiros foram mantidos em condições de laboratório com temperatura de $25\pm 5^\circ\text{C}$, U.R. de $75\pm 5\%$ e 12:12 (L:E) e diariamente foram oferecidas a elas folhas de *Acalypha wilkesiana* (DELLA LUCIA, 1993).

2.4 Bioensaio de toxicidade em dieta

No bioensaio de ingestão foi oferecida dieta artificial (BUENO *et al.*, 1997) para verificar a sobrevivência das formigas-cortadeiras. O experimento teve duração de quatro dias, sendo avaliada a sobrevivência a cada 24 horas. No primeiro, o tratamento controle foi mantido em dieta artificial, preparada com sacarose 10% e água destilada. Nos demais tratamentos foram colocados os compostos e as concentrações testadas diluídos na solução de sacarose. Foram usadas 120 operárias (jardineiras e forrageadoras) coletadas de cada colônia, sendo selecionadas quatro

colônias para o experimento. Foram ofertados, 200 µL por placa de Petri contendo 20 formigas. Foram submetidas à ingestão dos compostos dissulfeto de difenila e liral, contendo seis tratamentos, com quatro repetições nas concentrações de (0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/ml).

Após 24 horas do oferecimento da dieta, todos os tratamentos foram substituídos por dieta de manutenção com mel e água (1:1). A dieta foi pesada para verificar quanto foi consumido em cada tratamento. A mortalidade foi quantificada diariamente, sendo mantidas as formigas mortas dentro da placa até a última avaliação.

2.5 Bioensaio de toxicidade por via tópica às operárias de *Atta sexdens*

Este bioensaio teve como objetivo quantificar a toxicidade dessas substâncias às operárias de *A. sexdens*. Essa toxicidade foi avaliada por meio da aplicação tópica de soluções contendo as substâncias diluídas em acetona, nas concentrações de (0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/ml).

Utilizou-se três formigueiros de *A. sexdens* para realização dos testes. A unidade experimental foi formada por 350 operárias forrageadoras (cápsula cefálica: 2,0-2,2 mm) e 350 operárias jardineiras (cápsula cefálica: 0,8-1,0 mm). O bioensaio consistiu em 10 tratamentos (cinco concentrações de cada uma das duas substâncias e dois controles) de cinco repetições cada. As operárias forrageadoras receberam 1 µL da solução e as jardineiras receberam 0,5 µL da solução no tórax para cada concentração. O controle das operárias forrageadoras recebeu 1 µL da solução e as jardineiras receberam 0,5 µL da solução no tórax contendo apenas água.

Após esse procedimento inicial, 10 operárias foram dispostas em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro com suprimento de água e alimento (água e mel, 1:1).

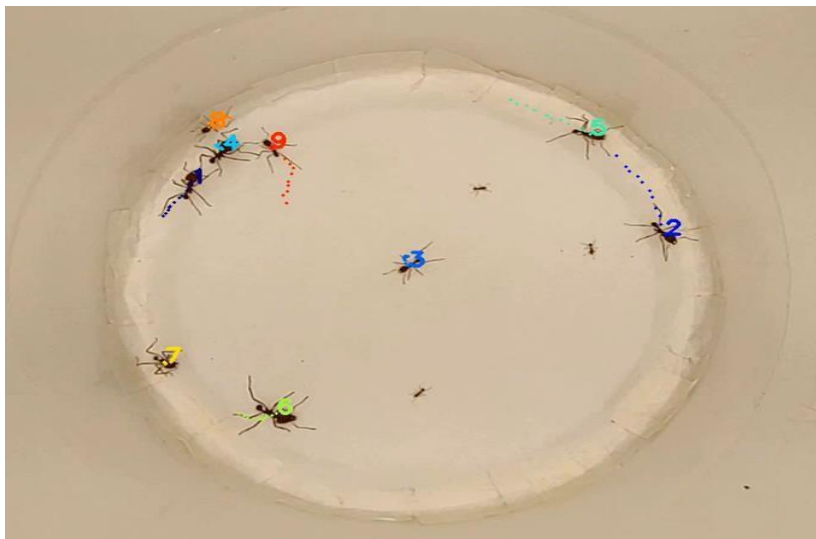
A sobrevivência foi avaliada diariamente durante sete dias. As formigas foram consideradas mortas e contabilizadas como tal quando se encontravam totalmente imóveis.

2.6 Avaliação das interações entre operárias forrageadoras e jardineiras

2.6.1 Registro do comportamento

As interações foram avaliadas após seis horas de exposição aos compostos testados. As formigas foram filmadas nas arenas (placa de Petri, 30 cm de diâmetro, 1 cm de altura) por 5 minutos com uma câmera de vídeo digital (Sony HDR-CX405) a 30 frame por segundo (fps) e alta definição (1920 × 1080 pixels). As gravações foram realizadas em uma sala a 25 ± 3 °C e $70 \pm 5\%$ de umidade relativa com duas lâmpadas de led (15 watts) colocadas 30 cm acima das arenas. Um grupo de 9 formigas (três forrageadoras tratadas, três forrageadoras não tratadas e três jardineiras) (Figura 1) da mesma colônia foi filmado em cada arena. As castas não tratadas foram usadas como controle. Nas forrageadoras tratadas foi realizada uma aplicação tópica de uma concentração (0,01mg/ml), pois houve mortalidade significativa dos dois compostos nesta concentração. Foi utilizado uma pipeta para realizar o procedimento. Foi registrado o comportamento de formigas provenientes de cinco colônias e para cada colônia foi registrado o comportamento de cinco grupos de 9 formigas.

Figura 1. Diagrama representando as operações envolvidas na segmentação de instâncias usadas no Ethoflow para avaliações do comportamento animal



2.6.2 Análise dos vídeos

Os procedimentos para análise dos vídeos foram baseados em processamento de imagem e inteligência artificial para rastrear os indivíduos mantendo suas identidades com alta acurácia. Inicialmente, métodos de processamento de imagem foram aplicados para pré-processar os vídeos. Como os vídeos foram registrados a 30 fps e o movimento dos indivíduos entre frames é muito pequeno, foram amostradas frames dos vídeos a cada 0,1 segundos. Após isso, suavização pelo filtro da mediana foi aplicada nos frames para eliminar ruídos e os vídeos foram salvos a 60 fps. Esses procedimentos aumentaram a eficiência das análises posteriores, pois os vídeos ficaram menores e com menos ruídos. Esse pré-processamento foi realizado usando a biblioteca OpenCV em python 3.7.

Para rastrear os indivíduos foi utilizado o programa idtracker.ai (ROMERO-FERRERO *et al.*, 2019), que utiliza modelos de inteligência artificial (redes neurais convolucionais) para estabelecer a identidade dos indivíduos durante o rastreamento. Dessa forma, foi possível obter a trajetória dos indivíduos com suas identidades e assegurando a acurácia da rotulagem das identidades (i.e., porcentagem de frames em que as identidades foram rotuladas corretamente). Dentre os cinco vídeos registrados para cada colônia, selecionou-se um vídeo com maior acurácia para as etapas posteriores. Assim, foram analisados vídeos com acurácia > 92%, para garantir a eficiência do processo.

Com os dados das trajetórias individuais, utilizou-se o algoritmo do programa Ethoflow para computar variáveis comportamentais associadas com a interação e proximidade entre os indivíduos (BERNARDES *et al.*, 2021). A interação entre os indivíduos foi avaliada através do número de vezes que cada par de indivíduos se aproximou a uma distância menor que a mediana das diagonais do corpo dos indivíduos em cada vídeo, acrescida de 50% (considerando a variação de tamanho entre os indivíduos). Além disso, foram estimadas variáveis relacionadas à proximidade dos indivíduos. Foram estimados a média, mediana, o mínimo e os percentis 10, 2, 1 e 0,5% das distâncias entre cada par de indivíduos na arena ao longo do tempo. A descrição matemática dessas variáveis pode ser encontrada em Bernardes *et al.* (2021). Todos os procedimentos de análise dos vídeos foram realizados em um computador com GNU/Linux Ubuntu 18.04 LTS de 64 bits (Intel i7-9750H CPU 2.60 GHz × 12; 20 GB RAM; GPU NVIDIA® GeForce® GTX 1660 Ti Max-

Q).

2.7 Análises estatísticas

Os dados de peso e proporção de área de crescimento do fungo foram submetidos à análise de desvios e modelo linear generalizado (GLM) usando a distribuição Gaussiana e Binomial, respectivamente. Em seguida, a normalidade e homoscedasticidade do resíduo do modelo foram verificadas usando o pacote “performance”. Quando necessária, a sobredispersão dos modelos foi ajustada e a significância dos tratamentos comparadas por contraste ($P < 0.05$), usando o pacote “stats”. Todas as análises foram realizadas no software R [version 4.2.1] usando a interface do RStudio [version 2022.2.3] (R Core Team 2022; RStudio Team, 2022).

Os dados de sobrevivência das operárias foram submetidos à análise de sobrevivência usando estimadores Kaplan-Meier (KAPLAN & MEIER, 1958) para a obtenção de curvas de sobrevivência através do programa Sigmaplot 12.0® e as comparações aos pares foram feitas com o Log-rank (PETO & PETO, 1972).

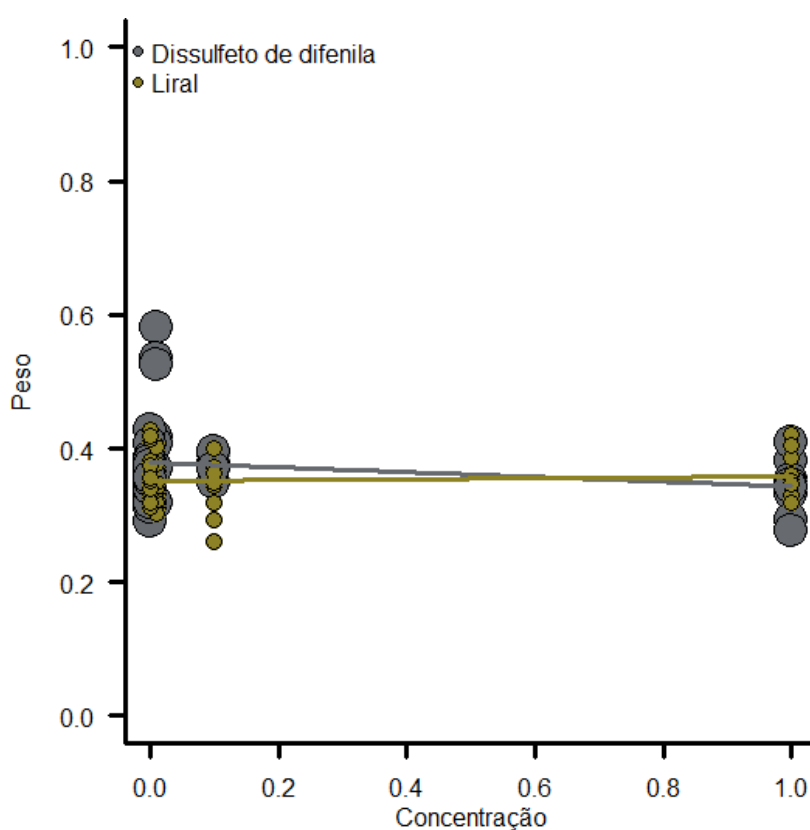
Os dados de interações entre as castas foram normalizados univariadamente (subtraindo da média e dividindo pelo desvio padrão) e submetidos à análise de componentes principais (PCA). Os autovalores e autovetores na PCA foram calculados a partir da matriz de covariância. Além disso, uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) com 10.000 permutações foi realizada para testar diferença significativa entre as castas e os tratamentos com as substâncias; também foi avaliada a interação estatística entre essas variáveis explicativas (casta e tratamento). Contrastes pareados entre níveis de castas e tratamentos foram realizados com ajuste de Holm. Um teste de homogeneidade de dispersão multivariada (PERMDISP) foi utilizado para verificar a suposição da homogeneidade da PERMANOVA (ANDERSON, 2017). Essas análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2022).

3. RESULTADOS

3.1 Toxicidade ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

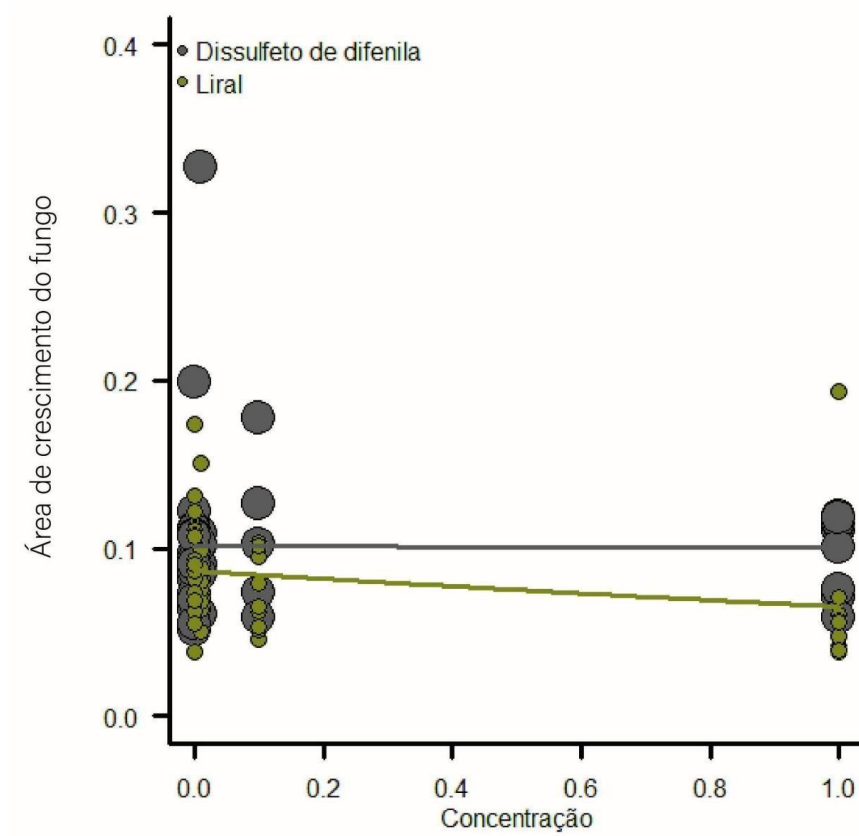
Não foi observada alteração na massa do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* quando exposto a diferentes concentrações de dissulfeto de difenila ($F_{1,48}=3,34$; $P=0,07$) ou liral ($F_{1,48}=0,25$; $P=0,62$) (Figura 2). O crescimento dos “plugs” foi semelhante em todas as concentrações em relação ao controle.

Figura 2: Peso do micélio de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura (meio), contendo compostos dissulfeto de difenila e liral nas concentrações de 0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/ml.



Não foi observada alteração na área de crescimento do fungo quando expostos a diferentes concentrações de dissulfeto de difenila ($\chi^2<0,01$; g.l.=1,48; $P=0,99$) ou de Liral ($\chi^2=0,05$; g.l.=1,48; $P=0,83$) (Figura 3). A massa de fungo produzida pelos tratamentos foi similar à massa referente à testemunha nas concentrações com dissulfeto de difenila e liral.

Figura 3: Área de crescimento do micélio de *Leucoagaricus gongylophorus* m meiode cultura (meio), contendo compostos dissulfeto de difenila e liral nas concentraçõesde 0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 mg/ml.



Com os resultados obtidos foi possível verificar que os compostos testados não inibiram o crescimento do fungo simbiote das formigas-ortadeiras (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura durante 2 semanas contendo diferentes concentrações de dissulfeto de difenila e liral

Tratamento (T)	Bioensaio de toxicidade ao fungo ^{1a} semana			Tratamento (T)	Bioensaio de toxicidade ao fungo ^{4a} semana		
T1				T1			
T2				T2			
T3				T3			
T4				T4			
T5				T5			
T6				T6			
T7				T7			
T8				T8			
T9				T9			
T10				T10			

Os tratamentos utilizados neste trabalho: (T1) dissulfeto de difenila 1mg/ml, (T2) dissulfeto de difenila 0,1mg/ml, (T3) dissulfeto de difenila 0,01mg/ml, (T4) dissulfeto de difenila 0,001mg/ml, (T5) liral 1mg/ml, (T6) liral 0,1mg/ml, (T7) liral 0,01mg/ml, (T8) 0,001mg/ml, (T9) controle água, (T10) controle acetona.

3.2 Toxicidade às operárias

Os resultados de dieta-artificial com os compostos dissulfeto de difenila em operária forrageadora ($\chi^2=4,62$, g.l.=5; $P =0,462$) e jardineira ($\chi^2=10,08$, g.l.=5; $P=0,07$) e liral, em operária forrageadora ($\chi^2=7,04$, g.l.=5; $P =0,22$), mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, já para as operárias jardineiras houve diferença significativa ($\chi^2=12,31$, g.l.=5; $P <0,03$) (Figuras 4 a 7). O período de avaliação de quatro dias foi adaptado baseando-se na sobrevivência do controle.

Figura 4- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de forrageadoras de *Atta sexdens*, após exposição à dieta contendo dissulfeto de difenila no decorrer dos quatro dias entre os tratamentos

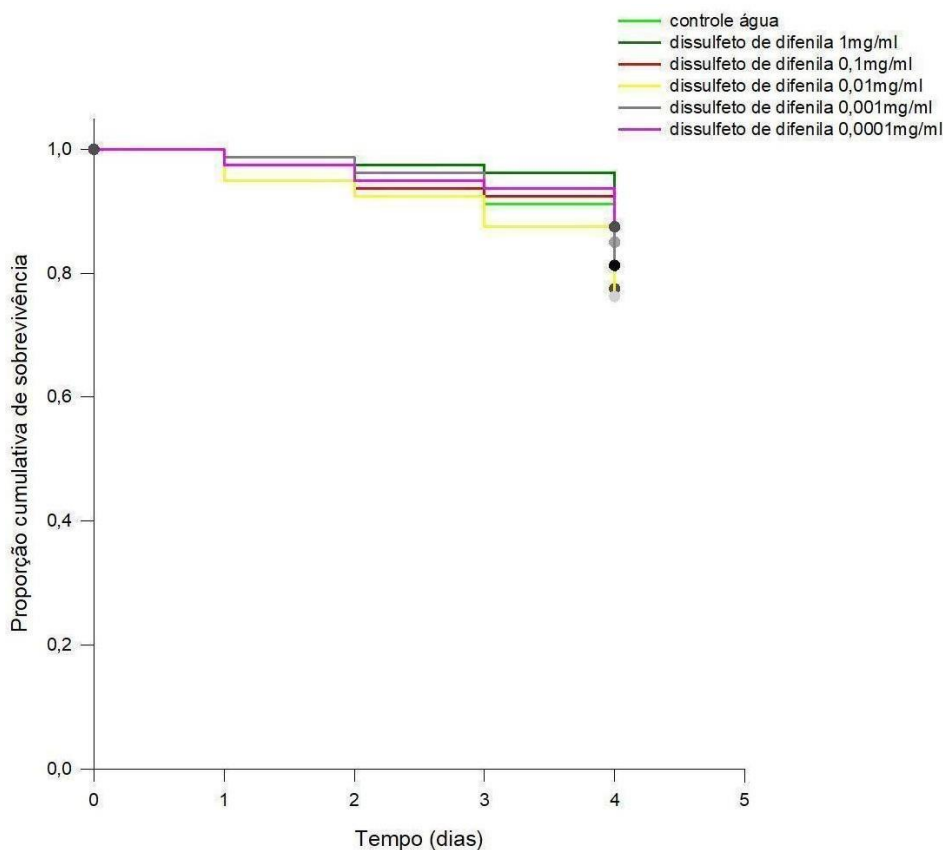


Figura 5- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de jardineiras de *Atta sexdens*, após exposição à dieta contendo dissulfeto de difenila no decorrer dos quatro dias entre os tratamentos

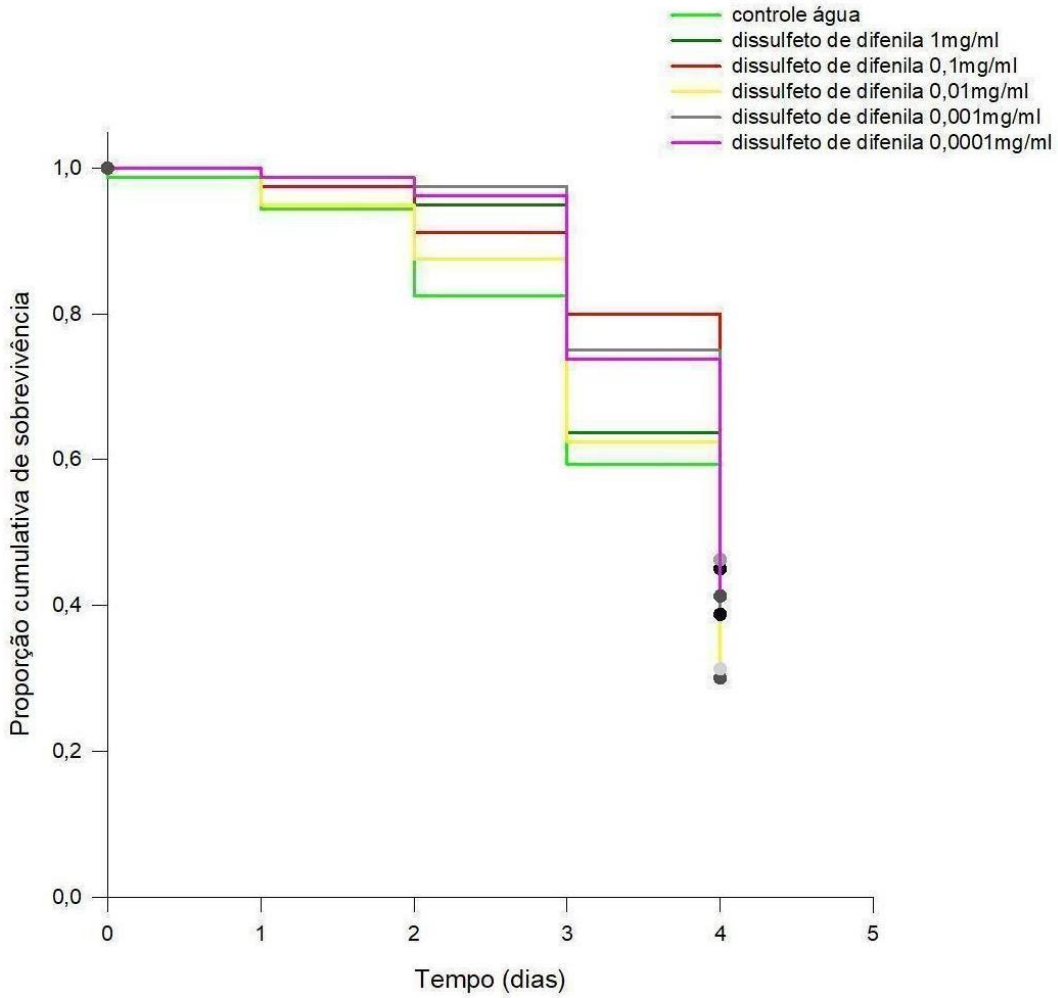


Figura 6- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias forrageadoras de *Atta sexdens*, após exposição à dieta contendo liral no decorrer dos quatro dias entre os tratamentos

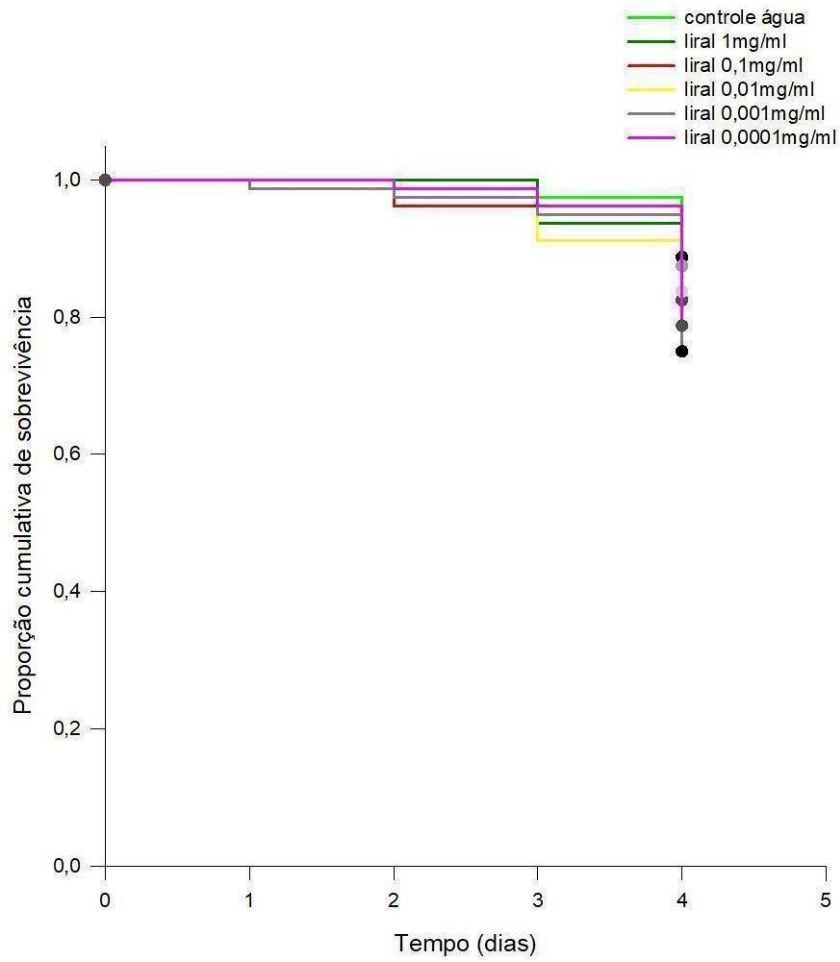
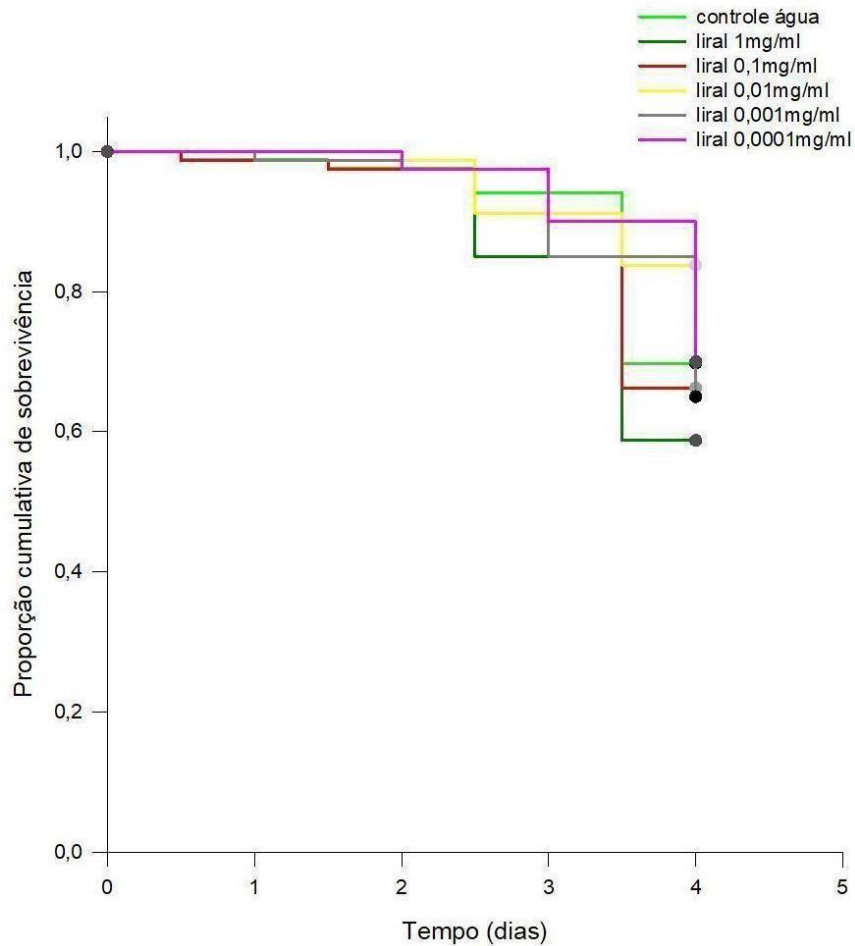


Figura 7- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias /jardineiras de *Atta sexdens*, após exposição à dieta contendo liral no decorrer dos 4 dias entre os tratamentos ($\chi^2=249,81$, g.l.=6; $P<0,001$).



Foi observado que a média do consumo da dieta artificial dos compostos dissulfeto de difenila e liral (Tabela 2), por operária forrageadora e jardineira, não se diferenciou no tratamento com água com as demais concentrações aplicadas.

Tabela 2. Média do consumo por operária dos tratamentos da dieta-artificial dos compostos dissulfeto de difenila e liral oferecidos para *Atta sexdens*.

Dissulfeto de difenila	Forrageadoras	Jardineiras
controle água	0.00251g	0.0029375g
1mg/ml	0.00375g	0.0024875g
0,1mg/ml	0.0050375g	0.008751g
0,01mg/ml	0.0040125g	0.0048875g
0,001mg/ml	0.0025375g	0.0050875g
0,0001mg/ml	0.00395g	0.0020875g
Liral	Forrageadoras	Jardineiras
controle água	0.00395g	0.002725g
1mg/ml	0.0018g	0.003525g
0,1mg/ml	0.002225g	0.0035625g
0,01mg/ml	0.00295g	0.0036875g
0,001mg/ml	0.0022875g	0.0032625g
0,0001mg/ml	0.0019625g	0.0029375g

Os resultados obtidos no bioensaio das concentrações de dissulfeto de difenila por aplicação tópica em formigas forrageadoras estão representados na figura 8 as (curvas de sobrevivência e da tabela 3 que contém a interpretação do teste “log-rank” 5% de probabilidade). Em *Atta sexdens* houve diferença significativa na sobrevivência entre os tratamentos após aplicação tópica com dissulfeto de difenila em forrageadoras.

No momento da aplicação, o tratamento com a concentração 1mg/ml apresentou uma rápida mortalidade logo nas primeiras horas; o comportamento das

formigas foi diferente do controle, ocorrendo sintomas de intoxicação como dificuldade de locomoção, tremor e paralisia. Este resultado demonstrou que o composto dissulfeto de difenila na concentração 1mg/ml exerceu ação tóxica por contato, matando 98% das operárias forrageadoras. Já as concentrações 0,1mg/ml e a 0,01mg/ml atingiram uma mortalidade aproximada de 95% e 92% respectivamente. O tempo médio de sobrevivência foi de quatro dias. Os grupos que receberam os tratamentos, comparados aos pares, resultaram em diferenças não significativas ($P > 0.05$).

Figura 8- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias forrageadoras de *Atta sexdens*, após aplicação tópica de dissulfeto de difenila 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)

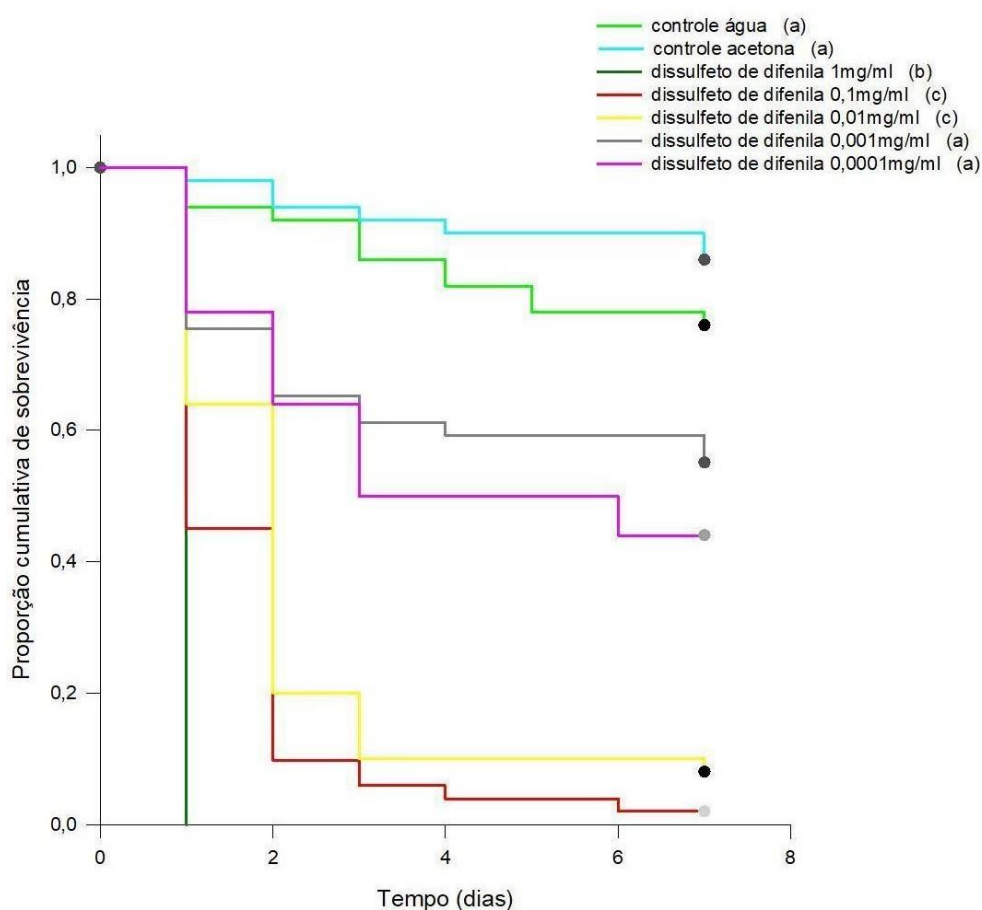


Tabela 3. Sobrevivência acumulada de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao tratamento por aplicação tópica de composto de dissulfeto de difenila de folhas de *Tropaeolum majus*. T1 – controle água; T2 – controle acetona; T3 – 1mg/ml; T4 – 0,1mg/ml; T5 – 0,01mg/ml; T6 – 0,001mg/ml; T7 – 0,0001mg/ml. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” ($p < 0,05$).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
T1	-	p<0,360	p<0,000*	p<0,000*	p<0,00001*	p<0,0701	p<0,00285*
T2	p<0,360	-	p<0,000*	p<0,000*	p<0,000*	p<0,00265*	p<0,0000423*
T3	p<0,000*	p<0,000*	-	p<0,000000759*	0,00000000114*	p<0,00001*	p<0,00001*
T4	0,000	p<0,000*	0,000000759*	-	p<0,0974	p<0,00000000503*	0,000000346*
T5	p<0,00001*	p<0,000*	<0,00000000114*	p<0,0974	-	p<0,0000111*	p<0,0000895*
T6	p<0,0701	p<0,00265*	p<0,00001*	0,00000000503*	p<0,0000111*	-	p<0,350
T7	p<0,00285*	0,0000423*	p<0,00001*	0,000000346*	p<0,0000895*	p<0,350	-

Houve diferença de sobrevivência entre *Atta sexdens* jardineiras ($\chi^2 = 360,99$, g.l.=6; $P < 0,001$). As análises feitas no bioensaio das concentrações de dissulfeto de difenila por aplicação tópica estão representadas na figura 9 que contém as curvas de sobrevivência e da tabela 4, que contém a interpretação do teste "log-rank" com 5% de probabilidade.

A concentração de dissulfeto de difenila a 1mg/ml ocasionou a morte de aproximadamente 98% em 24 horas. As concentrações 0,1mg/ml e 0,01mg/ml em 48 horas apresentaram uma toxicidade para as operárias jardineiras, atingindo uma mortalidade acima de 90% de jardineiras mortas. Já nas demais concentrações houve aumento gradativo na mortalidade ao longo dos 7 dias de experimento. O tempo médio de sobrevivência foi de 4 dias.

Os grupos que receberam os tratamentos, comparados aos pares, resultaram em diferenças não significativas (entre controle acetona e 0,001mg/ml: $P = 0,39$; entre controle água e 0,001mg/ml: $P = 0,37$; entre controle acetona e 0,0001: $P = 0,32$ e entre 0,1mg/ml e 0,01mg/ml: $P = 0,32$).

Figura 9- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias jardineiras de *Atta sexdens*, após aplicação tópica de dissulfeto de difenila 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)

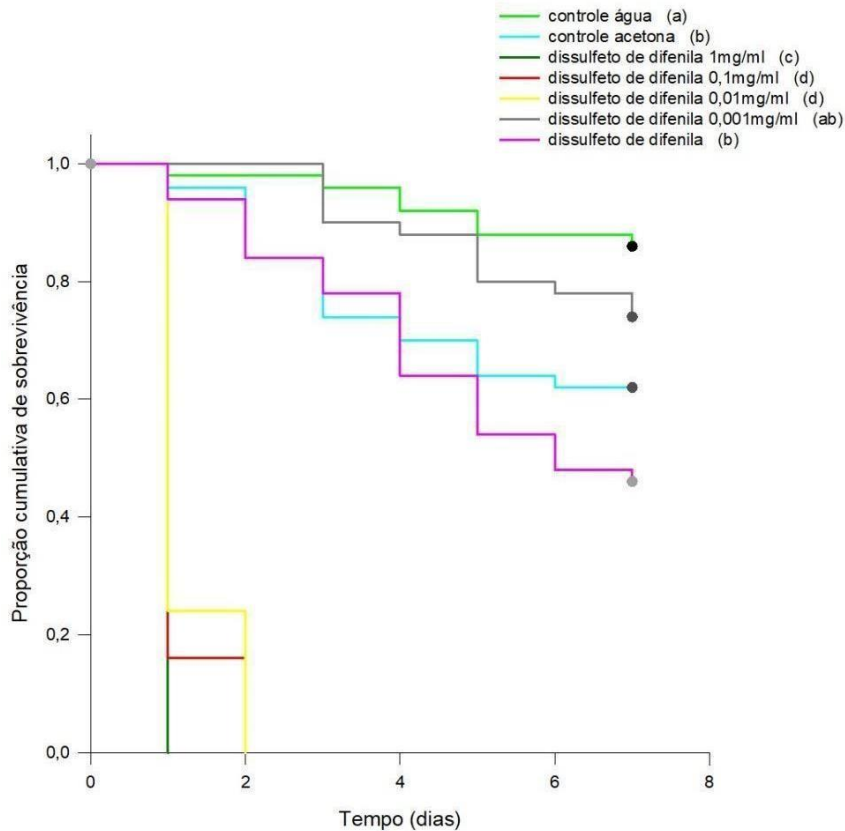


Tabela 4. Sobrevivência acumulada de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao tratamento por aplicação tópica de composto de dissulfeto de difenila de folhas de *Tropaeolum majus*. T1 – controle água; T2 – controle acetona; T3 – 1mg/ml; T4 – 0,1mg/ml; T5 – 0,01mg/ml; T6 – 0,001mg/ml; T7 – 0,0001mg/ml. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” ($p < 0,05$).

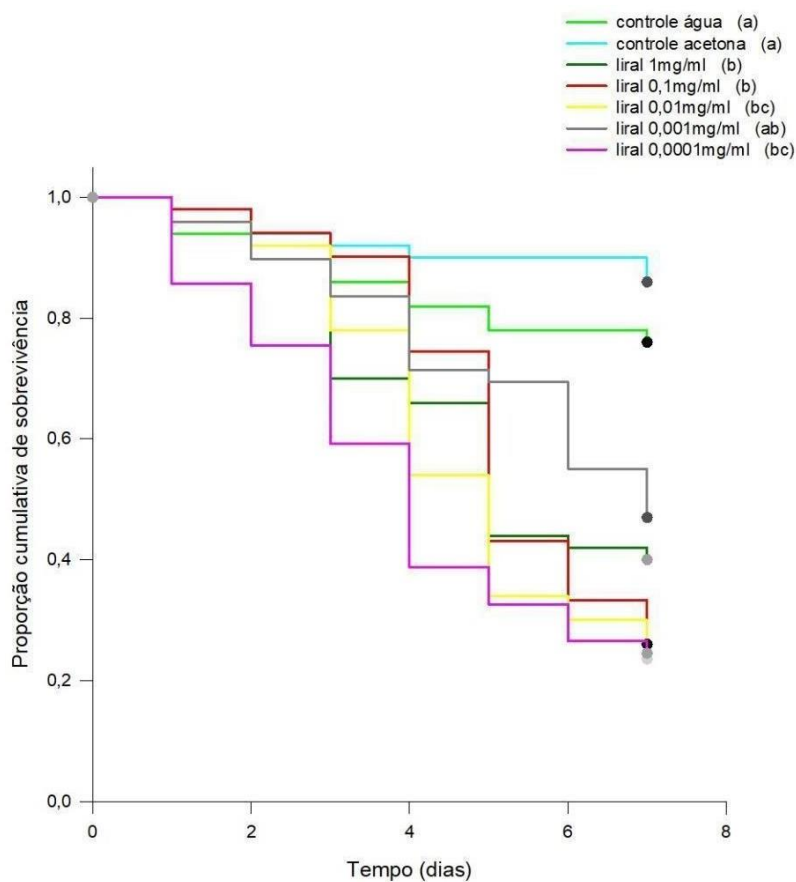
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
T1	-	$p < 0,0231^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,373$	$p < 0,00017^*$
T2	$p < 0,0231^*$	-	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,395$	$p < 0,325$
T3	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	-	$p < 0,0199^*$	$p < 0,00191^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$
T4	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,0199^*$	-	$p < 0,320^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$
T5	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,00191^*$	$p < 0,320$	-	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$
T6	$p < 0,373$	$p < 0,395$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	-	$p < 0,0170^*$
T7	$p < 0,00017$	$p < 0,325$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,000^*$	$p < 0,0170^*$	-

Houve diferença significativa na sobrevivência com aplicação tópica de liral para forrageadoras ($\chi^2=71,79$, g.l.=6; $P<0,001$). As análises feitas no bioensaio das concentrações de liral por aplicação tópica estão representadas na figura 10 que contém as curvas de sobrevivência e da tabela 5, que contém a interpretação do teste “log-rank” 5% de probabilidade mostrando os grupos que receberam os tratamentos, comparados aos pares e não houve diferenças não significativas.

A sobrevivência das operárias acumulada (%) por dia aumentou gradativamente durante o decorrer do bioensaio. O tempo médio de sobrevivência foi de 5 dias.

Figura 10- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias forrageadoras de *Atta sexdens*, após aplicação tópica de liral 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)

Tabela 6. Sobrevivência acumulada de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao



Tratamento por aplicação tópica de composto de liral de folhas de *Tropaeolum majus*. T1 – controle água; T2 – controle acetona; T3 – 1mg/ml; T4 – 0,1mg/ml; T5 – 0,01mg/ml; T6 – 0,001mg/ml; T7 – 0,0001mg/ml. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” ($p < 0,05$).

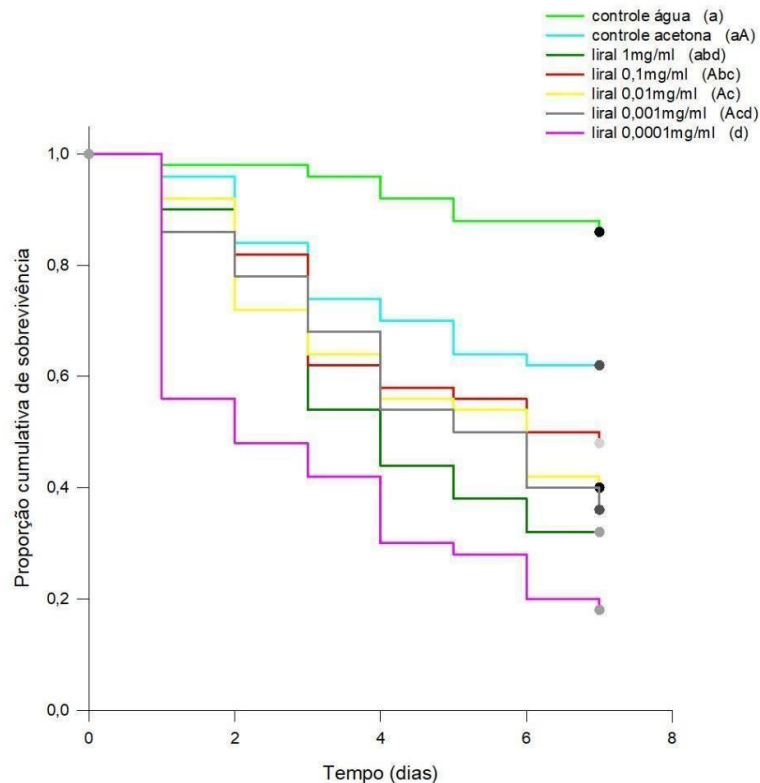
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
T1	-	$p < 0,737$	$p < 0,00880^*$	$p < 0,0000496$ *	$p < 0,0000498$ *	$p < 0,0767$	$p < 0,0000059$ 4*
T2	$p < 0,737$	-	$p < 0,0000501$ *	0000000219*	0000000517*	$p < 0,000802^*$	0,0000000748*
T3	$p < 0,00880^*$	$p < 0,0000501$ *	-	$p < 0,659$	$p < 0,684$	$p < 0,690$	$p < 0,243$
T4	$p < 0,0000496$ *	0000000219*	$p < 0,659$	-	$p < 0,452$	$p < 0,256$	$p < 0,526$
T5	$p < 0,0000498$ *	0000000517*	$p < 0,684$	$p < 0,452$	-	$p < 0,158$	$p < 0,748$
T6	$p < 0,0767$	$p < 0,000802^*$	$p < 0,690$	$p < 0,256$	$p < 0,158$	-	$p < 0,0307^*$
T7	$p < 0,0000059$ 4*	0,0000000748*	$p < 0,243$	$p < 0,526$	$p < 0,748$	$p < 0,0307^*$	-

Houve diferença significativa na sobrevivência com aplicação tópica de liral para jardineiras ($\chi^2=65,93$, g.l.=6; $P < 0,001$). As análises feitas no bioensaio das concentrações de liral por aplicação tópica estão representadas na figura 11 que contém as curvas de sobrevivência e da tabela 6, que contém a interpretação do teste “log-rank” a 5% de probabilidade mostrando os grupos que receberam os tratamentos, comparados aos pares e resultaram em diferenças não significativas.

A sobrevivência acumulada (%) por dia teve um aumento gradativo durante o tempo de experimento. Porém, não houve mortalidade de 100% em nenhuma delas. O tempo médio de sobrevivência foi de 5 dias.

Figura 11- Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias jardineiras de *Atta sexdens*, após aplicação tópica de liral 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)

Tabela 7. Sobrevivência acumulada de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao tratamento por aplicação tópica de composto de liral de folhas de *Tropaeolum majus*.



T1 – controle água; T2 – controle acetona; T3 – 1mg/ml; T4 – 0,1mg/ml; T5 – 0,01mg/ml; T6 – 0,001mg/ml; T7 – 0,0001mg/ml. * Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com a interpretação do teste “log-rank” ($p < 0,05$).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
T1	-	$p < 0,0589$	$p < 0,0589,000000243^*$	$p < 0,000511^*$	$p < 0,000020$	$p < 0,000003$	$p < 0,00001^*$
T2	$p < 0,0589$	-	$p < 0,0547$	$p < 0,695$	$p < 0,257$	$p < 0,161$	$p < 0,000026$
T3	$,000000243^*$	$p < 0,0547$	-	$p < 0,642$	$p < 0,895$	$p < 0,790$	$p < 0,218$
T4	$p < 0,000511^*$	$p < 0,695$	$p < 0,642$	-	$p < 0,829$	$p < 0,850$	$p < 0,00485^*$
T5	$p < 0,000020$	$p < 0,257$	$p < 0,895$	$p < 0,829$	-	$p < 0,769$	$p < 0,0399^*$
T6	$p < 0,000003$	$p < 0,161$	$p < 0,790$	$p < 0,850$	$p < 0,769$	-	$p < 0,0755$
T7	$p < 0,00001^*$	$p < 0,000026$	$p < 0,218$	$p < 0,00485^*$	$p < 0,0399^*$	$p < 0,0755$	-

5*

3.3 Interações entre operárias forrageadoras e jardineiras

A concentração 0,1mg/ml apresentou toxicidade para *Atta sexdens* nas duas castas tratadas por aplicação tópica para os dois compostos testados. Assim, foram realizados novos bioensaios para verificar os efeitos dos compostos na interação entre as castas.

A análise dos vídeos apresentou alta acurácia (mediana = 96.3) na rotulagem da identidade dos indivíduos, indicando a adequabilidade da análise. A pressuposição de dispersão homogênea não foi rejeitada quanto as castas (PERMIDISP: $F_{2, 27} = 0.58$, $P = 0.57$) e nem quanto aos tratamentos (PERMADISP: $F_{1, 28} = 3.36$, $P = 0.08$) demonstrando a adequabilidade da PERMANOVA. Houve diferença significativa entre os tratamentos (PERMANOVA: $F_{1, 24} = 4.1$, $P = 0.008$) (Tabela 7, Figura 12A e B) e interação estatística entre as variáveis explicativas casta e tratamento (PERMANOVA: $F_{2, 24} = 2.35$, $P = 0.03$) (Tabela 7, Figura 12A e B). A variável número de interações apresentou autovetor negativo e oposto em relação às outras variáveis (Figura 12C). Além disso, a correlação indicou que o número de interações é inversamente proporcional às outras variáveis (Figura 12C). Dessa forma, na PCA o grupo com centróide mais negativo apresentou mais interações e os indivíduos permaneceram mais próximos. Portanto, houve maior interação entre forrageadoras tratadas e não tratadas com dissulfeto de difenila (Tabela 7, Figura 12E).

Tabela 8. Contrastes entre os tipos de interações entre castas e os tratamentos na análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) a partir dos dados comportamentais de formigas *Atta sexdens* das castas forrageadora tratada (FT), forrageadora não tratada (FNT) e Jardineira não tratada (J) submetidas aos tratamentos com os compostos dissulfeto de dissulfeto de difenila e liral. Houve interação significativa entre castas e os tratamentos, os contrastes foram realizados dentro de cada nível das variáveis explicativas.

Variável explicativa	Contraste	F	p	R ²
F_N_T-F_T	Dissulfeto de difenila vs Liral	3.60	0.04	0.31
F_N_T-J	Dissulfeto de difenila vs Liral	2.36	0.07	0.23
F_T-J	Dissulfeto de difenila vs Liral	2.13	0.10	0.21
Dissulfeto de difenila	F_N_T-F_T vs F_N_T-J	4.01	0.02	0.33
Dissulfeto de difenila	F_N_T-F_T vs F_T-J	3.34	0.03	0.29
Dissulfeto de difenila	F_N_T-J vs F_T-J	0.56	0.66	0.07
	F_N_T-F_T vs F_N_T-J	0.83	0.57	0.09
Liral				
Liral	F_N_T-F_T vs F_T-J	0.73	0.50	0.08
Liral	F_N_T-J vs F_T-J	0.30	0.89	0.04

Figura 12. Comportamento das castas forrageadora tratada (FT), forrageadora não tratada (FNT) e jardineira não tratada (J) da formiga *Atta sexdens* submetidas aos tratamentos de dissulfeto de difenila e liral. (A) Representação das redes de interação entre as castas. Os símbolos (quadrado, círculo e triângulo) são os nós da rede e representam os indivíduos das diferentes castas. As conexões entre os nós são as arestas nas quais a espessura representa a proporção de interações entre os indivíduos. (B) ordenação da análise de componentes principais (PCA). Cada ponto representa uma amostra (n = 30) e as elipses representam o intervalo de confiança de 95% para cada tratamento/grupo. (C) autovetores das variáveis comportamentais mensuradas obtidas na PCA. As direções das setas mostram as cargas relativas das variáveis no primeiro e segundo componentes principais. (D) Diagrama de correlações entre as variáveis comportamentais mensuradas. (E) gráfico de radar indicando a média (pontos) ± desvio padrão (elipse convexa translúcida) do número de interações em cada tratamento. O eixo (de 0 a 340) indica interação.

4. DISCUSSÃO

Esta pesquisa investigou, pela primeira vez, a eficiência na utilização dos compostos dissulfeto de difenila e liral em operárias de formigas-cortadeiras de *Atta sexdens*, bem como para seu fungo mutualístico. Quando os compostos foram aplicados em *L. gongylophorus*, a hipótese H_0 foi confirmada, indicando que não houve efeito fungicida sobre o fungo; o crescimento do fungo ocorreu tanto em diâmetro, quanto em massa comparado a testemunha após a aplicação das diferentes concentrações dos compostos. Assim, esses compostos não constituem forma de controle eficiente ao fungo simbiote.

Resultado diferente foi apresentado no trabalho de Ribeiro (2011) testando efeito fungicida de extratos hexânico e etanólico de folhas de chaguinha *Tropaeolum majus* L., em que ambos os extratos provocaram a inibição do crescimento do fungo, apresentando efeito fungicida. O extrato etanólico na fração clorofórmica teve uma maior atividade. Zanetti e seus colaboradores (2003a) encontraram resultados parecidos avaliando frações hexânica e clorofórmica do extrato etanólico de *Tropaeolum majus* L., pelo método de bioautografia, contra bactérias gram-positivas e negativas apresentando halos de inibição para todos os microrganismos testados. Outro estudo relatou o efeito antifúngico do extrato etanólico de *Tropaeolum majus* a 0,4% sobre *Trichophyton mentagrophytes* em *Rattus norvegicus* (AGUILAR-VILLANUEVA *et al.*, 2017). Porém, existem poucas pesquisas avaliando o extrato obtido da chaguinha com relação a sua atividade antimicrobiana (BAZYLKO *et al.*, 2013).

As folhas de *T. majus* contêm diversos compostos, dentre eles os flavonoides (isoquercitrina, quercetina e kaempferol) que se destacam por exibirem atividade anti-inflamatória e antioxidante (DUGAS JUNIOR *et al.*, 2000). Muitos trabalhos encontrados avaliaram os efeitos dos extratos vegetais (BAZYLKO *et al.*, 2015; JURCA *et al.*, 2018), mas são raros os estudos que identificaram quais substâncias causam o efeito tóxico no fungo simbiote das formigas-cortadeiras. O trabalho de Gandra (2016) analisou a toxicidade da substância quercetina isolada de folhas de chaguinha *Tropaeolum majus* L. sobre o fungo simbiótico aplicado ao meio de cultura. Foi observado que o composto não afetou o crescimento do fungo; o desenvolvimento do “pellet” fúngico ocorreu tanto em diâmetro quanto em massa ao aplicar diferentes concentrações de quercetina, não diferindo do resultado com o meio de cultura

testemunha.

O dissulfeto de difenila e liral não apresentaram diferença significativa em dieta-artificial quando comparado ao controle, rejeitando a H_1 . Os resultados encontrados nos testes de dieta-artificial apresentaram um baixo efeito tóxico nas operárias quando comparado ao controle; não houve diferença nenhuma entre as concentrações testadas. Contudo, devido a ação de metabólitos secundários presentes na chaguinha, pode ocorrer uma repelência aos insetos herbívoros, o que ainda deve ser investigado.

Ghedira & Goetz (2013) relataram a ocorrência de glicosinolatos, flavonoidese ácidos fenólicos em sua maior parte, na composição química da planta. Entretanto, Ribeiro (2011) relatou que testes realizados em campo com colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizando folhas de *Tropaeolum majus* tiveram uma ótima atratividade quando impregnadas em pó em iscas granuladas. Embora tenha obtido este resultado é importante destacar que as formigas-cortadeiras estavam em contato somente com as folhas de chaguinha, proporcionando uma exposição mais direta devido ao pouco espaço presente na placa de Petri, favorecendo um aumento de contato entre elas.

O estudo realizado por Torres *et al.* (2013), onde foram testados 70 extratos de plantas, sendo uma delas *T. majus* em dieta de formiga-cortadeira, não apresentou taxa de mortalidade significativa. O autor ressalta que o teor dos princípios ativos pode variar de acordo com condições edafoclimáticas, e fatores como o tipo de solventes utilizados na extração dos compostos químicos, podem ter diferentes efeitos sobre os insetos.

Na aplicação tópica, ambos os compostos testados causaram mortalidade significativa tanto para as operárias forrageadoras como para as jardineiras, aceitando-se a H_1 . O composto dissulfeto de difenila causou efeitos letais às operárias forrageadoras por ação tópica e também afetou a sobrevivência das operárias jardineiras logo nas primeiras 24 horas. O composto liral apresentou uma redução da sobrevivência ao decorrer dos sete dias de avaliação para as duas castas. A expectativa de encontrar novos compostos com potencial de controle para formigas-cortadeiras para formulação em iscas não se mostra uma alternativa viável, mas existe a necessidade de novas avaliações no uso de novas formulações que poderão ter efeito no controle de formigas-cortadeiras.

Os métodos de controle químico de formigas-cortadeiras são feitos pelas empresas de reflorestamento com iscas, termonebulização e fumigantes (BOARETTO

& FORTI, 1997). É importante que o inseticida não seja tóxico a forrageadoras ou tenha ação retardada, ou seja, mostre lenta atividade tóxica para que possibilite sua distribuição por toda a colônia antes que ocorram os primeiros sintomas de envenenamento, e agir por ingestão (DELABIE *et al.*, 2000; DE BRITTO *et al.*, 2016). Assim, comprometer diretamente as operárias menores, o jardim de fungo ou a formiga rainha são as estratégias mais eficazes (GANDRA *et al.*, 2016; MOUTINHO *et al.*, 2003). As iscas tóxicas precisam de características que não venham a provocar a morte das operárias forrageadoras imediatamente para que ocorra a distribuição do inseticida na colônia. Porém, compostos que ocasionam uma letalidade em operárias forrageadoras levam a paralisação dos danos causados à planta pela interrupção dos cortes foliares, comprometendo o cultivo do fungo das formigas-cortadeiras.

Outro método de controle químico que apresenta alta eficiência é a termonebulização. A termonebulização pode ser utilizada em qualquer época do ano, em diferentes tipos de terreno, seco ou encharcados. É um método alternativo em relação ao uso de isca, podendo ser utilizado, principalmente, no período chuvoso (ZANETTI *et al.*, 2008). O controle é feito diretamente nos orifícios do formigueiro, com a ponta da lança do aparelho na entrada de cada olheiro, provocando refluxo da fumaça ocasionado pela nebulização, por outros olheiros (ZANETTI *et al.*, 2002). Vários estudos com espécies de plantas têm sido realizados com formigas-cortadeiras, tanto por via tópica como por ingestão, apresentando resultados positivos para mortalidade, demonstrando efeito tóxico (BUENO *et al.*, 2004). O modo de ação dos extratos vegetais e compostos puros pode apresentar diversos sintomas nos insetos comprometendo sua fertilidade, inibindo seu crescimento, causando toxicidade e a mortalidade dos mesmos (BEGUM *et al.*, 2011; JANNET *et al.*, 2001).

A utilização de extrato de *T. majus* aplicado em folhas de feijão no controle de *Diabrotica speciosa* se mostrou mais eficaz a longo prazo (ARRUDA; SOUTO, 2010). Pivoto *et al.* (2010) relataram a primeira pesquisa com o extrato aquoso e etanólico de *Tropaeolum majus* a 70%, com ação carrapaticida frente a cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Outro estudo com extratos aquosos e etanólico de *Tropaeolum majus* a 70% revelou a não toxicidade aguda sobre os camundongos nas doses de 0.625, 1.25, 2.5 e 5 g/kg de peso corporal, por via oral (ZANETTI *et al.*, 2003a).

Com relação às interações entre as castas estudadas, a hipótese foi aceita, pois ocorreu diferença significativa na interação entre as castas e tratamentos de operárias quando aplicado dissulfeto de difenila e liral. Houve interação entre a casta

de forrageadoras tratadas e forrageadoras não tratadas com o composto dissulfeto de difenila. Isso confirma os resultados de sobrevivência das operárias forrageadoras tratadas (figura 8), onde se observou alta taxa de mortalidade nos primeiros dias de avaliação do composto dissulfeto de difenila, demonstrando ser mais tóxico comparado ao liral que não houve uma interação entre as castas. Essa interação entre as castas acontece através de feromônios quando submetidas a compostos bioativos, e entender esses fatores é essencial, pois formigas-cortadeiras podem comprometer a ação de compostos químicos que prejudiquem a colônia e o fungo simbiote.

A comunicação dentro de uma colônia acontece através de sinais táteis e sonoros, todavia a maior quantidade de informação recebida vem da comunicação química (HOLLDOBLER & WILSON 1990). As formigas, quando ameaçadas, liberam feromônios que se difundem rapidamente entre as mesmas, desencadeando comportamento de alarme para agir contra a ameaça ocorrida (MARINHO *et al.*, 2006). Os feromônios de alarme produzidos na glândula mandibular têm a função de alertar indivíduos ou desencadear um comportamento agressivo desses indivíduos (BLUM, 1985; HOLLDOBLER & WILSON 1990). A abertura e o fechamento contínuo das mandíbulas, a corrida, a alternância de marcha curta e lenta, e marchas com cabeça e tórax elevados e abdômen rente ao solo são característica do comportamento de alarme das formigas-cortadeiras (GAZAL *et al.*, 2009).

O comportamento de “grooming” é utilizado para evitar a disseminação de doenças para a colônia (LACERDA *et al.*, 2011). Nos insetos sociais existem várias interações e uma das principais é o comportamento de limpeza mútua entre as companheiras do ninho e a auto-limpeza, quando ocorre a remoção dos organismos potencialmente patogênicos que estão na superfície de seu corpo (CREMER *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2017). As formigas da espécie *Lasius neglectus* quando expostas a agentes infecciosos externos a colônias, aumentaram o processo de autogrooming, e diminuíram a frequência de allogrooming (THEIS *et al.*, 2015). A estrutura de rede influencia a transmissão de agentes patogênicos (CHRISTLEY *et al.*, 2005) e, essa transmissão pode ocorrer pelo contato entre os membros de um grupo (GODFREY, 2013). Organismos conectados propiciaram uma maior infecção por parasitas quando comparados com os que não tinham uma interação (GODFREY *et al.*, 2009).

Gandra (2018) relata que as castas forrageadoras e lixeiras formam as redes mais centrais e as castas das babás ou jardineiras foram mais periféricas. Isso incorre em uma interação bem menor entre as castas após o oferecimento de chaguinha.

Indivíduos mais externos da rede e que realizam suas tarefas mais isolados, interagem bem menos com outras castas (MERSCH, 2016). As jardineiras preparam os pedaços de folhas, cortam em pequenos fragmentos e adicionam ao jardim de fungo, colocando micélios do fungo sobre o substrato (ARENAS & ROCES, 2016). As forrageadoras são operárias envolvidas nas atividades que exploram o ambiente onde vivem e selecionam o material, realizando assim, o corte e transporte de fragmentos foliares para o ninho (HOLLDOBLER & WILSON, 1990). A maneira que as forrageadoras interagem com o ambiente e com outras colônias pode influenciar no sucesso das colônias de cortadeiras, se irá permanecer ou expandir (PINTER-WOLLMAN, 2012). Contudo, os compostos aqui testados não comprometeram significativamente as interações nas colônias de forma a inviabilizá-las, apesar de diferirem entre si na dinâmica de interações entre castas, com o dissulfeto de difenila favorecendo essa interação e, portanto, sua distribuição na colônia em comparação ao liral.

Esta pesquisa, embora em fase inicial, indica possibilidades futuras no controle de formigas-cortadeiras. Pode-se constatar que os compostos usados foram capazes de causar mortalidade nas forrageadoras. Evidenciando que a aplicação tópica mesmo na menor concentração teve efeito na mortalidade das formigas.

5. CONCLUSÕES

Os compostos dissulfeto de difenila e liral de *Tropaeolum majus* não tiveram efetividade no controle do desenvolvimento do fungo mutualístico. A aplicação por ingestão nas duas castas trabalhadas não teve efeito significativo comparado ao controle. Já a aplicação tópica de ambos os compostos apresentou efeito significativo na sobrevivência das operárias forrageadoras e jardineiras. Dissulfeto de difenila influenciou na interação entre as castas forrageadoras tratadas e não tratadas. Portanto, o composto dissulfeto de difenila se mostra uma alternativa viável no controle de formigas-cortadeiras em relação ao método de termonebulização

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-VILLANUEVA, D. A. *et al.* Efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" sobre la micosis inducida por *Trichophyton mentagrophytes* en *Rattus norvegicus*. **Acta Médica Peruana**, v. 34, n. 3, p. 196-202, 2017.
- ANDERSON, M. J. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Wiley StatsRef: Statistics Reference Online, American Cancer Society (2017), pp. 1-15, 10.1002/9781118445112.stat07841
- APLIN, L. M. *et al.* Consistent individual differences in the social phenotypes of wild great tits, *Parus major*. **Animal Behaviour**, v. 108, p. 117-127, 2015.
- ARENAS, A. & ROCES, F. Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. **Animal Behaviour**, v. 115, p. 167-174, 2016.
- ARRUDA, A. S.; SOUTO, L. C. I. **Avaliação da atividade inseticida de extratos vegetais sobre *Diabrotica speciosa Germar (1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) in vitro***. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas e Ambientais) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MG, 2010.
- AYLWARD, F. O. *et al.* Enrichment and broad representation of plant biomass-degrading enzymes in the specialized hyphal swellings of *Leucoagaricus gongylophorus*, the fungal symbiont of leaf-cutter ants. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0134752, 2015.
- AYLWARD, F. O. *et al.* *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.
- BACCARO, F. B. *et al.* **Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Editora INPA. 2015.
- BAZYLKO, A. *et al.* Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 88-94, 2013.
- BAZYLKO, A. *et al.* Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 19-24, 2015.
- BEGUM, N. *et al.* Toxicity potential and anti AchE activity of some plant extracts in *Musca domestica*. **Journal of Biofertilizers and Biopesticides**, v. 2, n. 2, 1000108, 2011.
- BERNARDES, R.C. *et al.* Ethoflow: Computer Vision and Artificial Intelligence- Based Software for Automatic Behavior Analysis. **Sensors** 2021, 21, 3237. <https://doi.org/10.3390/s21093237>

BLATRIX, R. *et al.* Plant-ants use symbiotic fungi as a food source: new insight into the nutritional ecology of ant-plant interactions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1744, p. 3940-3947, 2012.

BLUM, M. S. **Alarm pheromones**. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol 9: Behavior, 1985.

BOARETTO, M. A. C., & FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BRANDÃO, C. R. F., MAYE-NUNES, A., & SANHUDO, C. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas- cotadeiras: da biologia ao manejo**, Viçosa: Editora UFV, p. 27-40, 2011.

BUENO, O. C. *et al.* Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 107-113, 1997.

BUENO, O. C. *et al.* Toxicity of sesame extracts to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, p. 599-606, 2004.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C. Plantas inseticidas: perspectivas de uso no controle de formigas-cortadeiras. **Formigas-Cortadeiras: Da Bioecologia ao Manejo**. Editora UFV, Viçosa, Brasil, p. 359-372, 2011.

CARDOSO, S. R. S. **Morfogênese de ninhos iniciais de *Atta spp.* (Hymenoptera: formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos**. 2010. Tese (Tese de doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2010, p. 149.

CHERRETT, J. M. Leaf-cutting ants In: Lieth H, Werger MJA, editors. **Tropical Rain Forest Ecosystems—Biogeographical and Ecological Studies**. vol. 2 Ecosystems of the World 14B. p. 473-488, 1989.

CURRIE, C. R; MUELLER, U. G; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999.

CREMER, S. *et al.* Social immunity. **Current biology**, v. 17, n. 16, p. 693-702, 2007.

DE BRITTO, J. S. *et al.* Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, n. 2, p. 11-96, 2016.

DELABIE, J. H. C.; LUCIA, T. D.; PASTRE, L. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex spp.* e *Atta spp.* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 843-848, 2000.

DELLA LUCIA, T. M. C. *et al.* **Criação de formigas cortadeiras em laboratório. As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C. *et al.* **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo.** Viçosa: Editora UFV, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C.; ANJOS, N.; ZANUNCIO, J. C. **Controle de formigas cortadeiras.** Viçosa: CTP, 2000.

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O. Caracterização dos ninhos. In: Della Lucia, T. M. C. (ed). **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, 1993, p.32–42.

DETRAIN, C.; DENEUBOURG, J. Self-organized structures in a superorganism: do ants “behave” like molecules?. **Physics of life Reviews**, v. 3, n. 3, p. 162-187, 2006.

DIEHL, E. **Interações das formigas com outros organismos: diversidade ecológica e evolutiva.** São Leopoldo: Oikos, 2017.

DUGAS JR. *et al.* Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure– activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 3, p. 327-331, 2000.

ERTHAL, M. J. **Enzimas digestivas presentes no intestino da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae) e no seu fungo mutualístico.** 2004. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2004.

GANDRA, L. C. **Formigas-cortadeiras versus chaguinha (*Tropaeolum majus*): personalidade, rede social e toxicidade.** Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, p. 45, 2018.

GANDRA, L. C. *et al.* Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. **Pest Management Science**, v. 72, n. 8, p. 1475- 1481, 2016.

GARCIA, I. P. *et al.* Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. **Sociobiology**, v. 42, n.2, p. 265-283, 2003.

GAZAL, V.; BAILEZ, O.; VIANA-BAILEZ, A. M. Mechanism of host recognition in *Neodohrniphora elongata* (Brown) (Diptera: Phoridae). **Animal Behaviour**, v. 78, n. 5, p. 1177-1182, 2009.

GHEDIRA, K. & GOETZ, P. *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **Phytothérapie**, v. 11, n. 5, p. 316-319, 2013.

GODFREY, S. S. Networks and the ecology of parasite transmission: a framework for

wildlife parasitology. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 2, p. 235-245, 2013.

GODFREY, S. S. *et al.* Social network structure and parasite infection patterns in a territorial reptile, the tuatara (*Sphenodon punctatus*). **International journal for parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1575-1585, 2010.

GODFREY, S. S. *et al.* Network structure and parasite transmission in a group living lizard, the gidgee skink, *Egernia stokesii*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, n. 7, p. 1045-1056, 2009.

GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. **Insetos: fundamento da entomologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

HENRIK, H. D. F. L. *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.

HOLMES, N. A. *et al.* Genome analysis of two *Pseudonocardia* phylotypes associated with *Acromyrmex* leafcutter ants reveals their biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 273, p. 1-16, 2016.

HOLLDOBBLER, B.; WILSON, E. O. The ants. Cambridge: Belknap, 1990, 600 p.

JANNET, H. B. *et al.* Antifeedant activity of plant extracts and of new natural diglyceride compounds isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves against *Spodopteralittoralis* larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 14, n. 3, p. 213-222, 2001.

JEANSON, R. Long-term dynamics in proximity networks in ants. **Animal Behaviour**, v. 83, n. 4, p. 915-923, 2012.

JURCA, T. *et al.* The effect of *Tropaeolum majus* L. on bacterial infections and in vitro efficacy on apoptosis and DNA lesions in hyperosmotic stress. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, 2018.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American statistical association**, v. 53, n. 282, p.457-481, 1958.

KEREBBA, N. *et al.* Pesticidal activity of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and *Tephrosia vogelii* (Hook f.); phytochemical isolation and characterization: A review. **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 366-376, 2019.

LACERDA, F. G. *et al.* Biologia comportamental das operárias do lixo das colônias de formigas cortadeiras. **Formigas-cortadeiras—da biologia ao manejo**, p. 226-235, 2011.

LENGAI, G. M.W.; MUTHOMI, J. W.; MBEGA, E. R. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. **Scientific African**, v. 7, p. e00239, 2020.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. **Biology letters**, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

LOPES, J. F. S. *et al.* The trade-off between the transmission of chemical cues and parasites: behavioral interactions between leaf-cutting ant workers of different age classes. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, p. 69-73, 2017.

MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C. PIKANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 2, p.18-21,2006.

MARSH, S. E. *et al.* Association between *Pseudonocardia* symbionts and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods. **International Microbiol**, v.16, p. 17-25, 2013.

MELO, C. R. *et al.* Synergistic effect of aromatic plant essential oils on the ant *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) and antifungal activity on its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 14, p. 17303-17313, 2020.

MERSCH, D. P. The social mirror for division of labor: what network topology and dynamics can teach us about organization of work in insect societies. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 70, n. 7, p. 1087-1099, 2016.

MOREIRA, D. D. O.; ERTHAL Jr. M.; SAMUELS, R. I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T. M. C. **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo**. Viçosa: Ed. UFV, p. 205-225, 2011.

MOUTINHO, P. *et al.* Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. **Ecology**, v. 84, n. 5, p. 1265-1276, 2003.

MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **The American naturalist**, v. 160, n. 4, p. S67-S98, 2002.

MUELLER, U. G. *et al.* The origin of the attine ant-fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.

LAZZARI, E. FERNANDES, J. V. M.; CARVALHO, R. I. N. PINTO JÚNIOR, A. R. Biocida natural para o combate de formigas cortadeiras. **Brazilian Journal Technology**, v. 2, n. 1, p. 513-522, 2019.

PAGNOCCA, F. C. *et al.* Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of entomological research**, v. 80, n. 3, p. 349-352, 1990.

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

PINTER-WOLLMAN, N. Personality in social insects: how does worker personality determine colony personality?. **Current Zoology**, v. 58, n. 4, p. 580-588, 2012.

PIVOTO, F. L. *et al.* Ação acaricida in vitro de *Tropaeolum majus* sob teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2141-2145, 2010.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

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

RIBEIRO, M. M. R. *et al.* Effect of plant extracts on survival of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 52, n. 2, p. 387-398, 2008.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

ROMERO-FERRERO, F., BERGOMI, M.G., HINZ, R.C. *et al.* idtracker.ai: tracking all individuals in small or large collectives of unmarked animals. **Nature Methods** 16, 179–182 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0295-5>

SANTOS, A. V. *et al.* Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS microbiology letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.

SANTOS, T. T.; CAZETTA, M. L. Formigas da tribo Attini e sua interação com microrganismos. **Revista Científica da FHO/Uniararas**, v. 4, n. 1, p. 36-44, 2016.

SOUZA, D. J.; SANTOS, JF LOPES; DELLA LUCIA, T. M. C. Organização social das formigas cortadeiras. **Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 127-137, 2011.

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.

SUEN, G. *et al.* **The Microbiome of Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens**. Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats, p. 367-379, 2011.

THEIS, F. J.; UGELVIG, L. V.; MARR, C.; CREMER, S. Opposing effects of allogrooming on disease transmission in ant societies. **Philosophical Transactions of Royal Society B**, 370, p. 20140108, 2015.

TORRES, A. F. *et al.* Atividade inseticida de extratos de plantas no controle de formigas cortadeiras, em cafeeiro. **Coffee Science**, v. 8, n. 3, p. 371-378, 2013.

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

VIANA-BAILEZ, A. M.; BAILEZ, O.; MALAQUIAS, K. da S. **Comunicação química em formigas-cortadeiras. Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Ed. UFV, p. 141-164, 2011.

WATERS, J. S.; FEWELL, J. H. Information processing in social insect networks. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40337, 2012.

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

WIRTH, R. *et al.* **Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama**. Springer Science & Business Media, 2002.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SOUZA-SILVA, A.; SANTOS, A. D., & GODOY, M. S. **Manejo integrado de cupins**. Lavras: Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, 2010.

ZANETTI, R. *et al.* Eficiência de produtos termonebulígenos no controle de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em plantio de eucalipto. **Ciência e Agroecologia**, v. 32, n. 4, p. 1313-1316, 2008.

ZANETTI, G. D. *et al.* Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 159-162, 2003a.

ZANETTI, R. *et al.* **Manejo Integrado de formigas cortadeiras**. Lavras: UFLA, 2002. 16p.

ZANETTI, R. *et al.* Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Sociobiology**, v. 42, n. 2, p. 433-442, 2003b.

ZANUNCIO, J. C. *et al.* The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals of Forest Science**, v. 73, n. 2, p. 205-214, 2016.

ZANUNCIO, J. C. *et al.* Aferição de dosagens de iscas granuladas para controle de *Atta laevigata* (F. Smith) pelo número de olheiros ativos. **Rev. Árvore**, v. 20, p. 241-246, 1996.