



**JULIANA CRISTINA DOS SANTOS**

**TOXICIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS E  
SUAS FRAÇÕES PARA *Atta sexdens* LINNAEUS,  
1758 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e seu  
fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*  
(MOLLER) SINGER (AGARICALES:  
AGARICACEAE)**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**JULIANA CRISTINA DOS SANTOS**

**TOXICIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS E SUAS FRAÇÕES PARA  
*Atta sexdens* LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e seu  
fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (MOLLER) SINGER  
(AGARICALES: AGARICACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Ronald Zanetti Bonetti Filho

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Santos, Juliana Cristina dos.

Toxicidade de extratos vegetais e suas frações para *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Formicidae) e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (Moller) Singer (Agaricales: Agaricaceae) / Juliana Cristina dos Santos. – Lavras : UFLA, 2013. 220 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ronald Zanetti Bonetti Filho.

Bibliografia.

1. Pragas florestais. 2. Manejo integrado. 3. Extrato de plantas. 4. Formigas cortadeiras. 5. Controle de pragas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 595.796

**JULIANA CRISTINA DOS SANTOS**

**TOXICIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS E SUAS FRAÇÕES PARA  
*Atta sexdens* LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e seu  
fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (MOLLER) SINGER  
(AGARICALES: AGARICACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 01 de Março de 2013.

Dra. Cidália Gabriela Santos Marinho	UFSJ
Dr. Denilson Ferreira de Oliveira	UFLA
Dr. Geraldo Andrade Carvalho	UFLA
Dr. Martin Francisco Pareja	UFLA

Dr. Ronald Zanetti Bonetti Filho  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por iluminar meus passos principalmente nos momentos de dificuldades.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Entomologia (DEN) pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação em Entomologia Agrícola.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos professores Ronald Zanetti e Denilson Ferreira de Oliveira pela valiosa orientação durante o doutorado e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao professor Fernando Pagnocca por ter aberto as portas do Centro de Estudo de Insetos Sociais da Unesp de Rio Claro (CEIS) para a confecção de parte da tese de doutorado e pela orientação durante esta fase experimental.

A química Giovanna Cardoso Gajo e ao Biólogo Samuel Guilherme Pereira, pela troca de conhecimento, carinho e principalmente a amizade.

Ao meu namorado Josimar Santana Ribeiro, pela paciência, carinho, amor e compreensão.

Ao meu pai José Osmar da Silva, minha mãe Celina Aparecida dos Santos, e aos meus irmãos Camila Gonçalves dos Santos, Talita Aparecida dos S. Silva e Maurício Heitor da Silva, que mesmo estando distantes me deram apoio necessário para esta caminhada.

Aos funcionários do DEN/UFLA, principalmente a Léia, Dona Irene, Júlio Augusto, Roseni e Lisiane pelo imenso carinho e cordialidade.

Aos meus colegas de laboratório Estephanni, Willian, Juara, Vinícios, Alexandre S., Alexandre A., Elisângela, Vaneska, pelo carinho e amizade durante estes quatro anos de jornada.

“Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma. Até quando o corpo pede um pouco mais de alma, a vida não para...”

Oswaldo Lenine Macedo Pimentel

## RESUMO

Estudou-se o potencial de extratos vegetais e suas frações no controle de *Atta sexdens* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Este trabalho constituiu-se de três bioensaios. No primeiro, realizou-se um *screening* de extratos vegetais para verificar o potencial formicida oferecido via ingestão para possível uso em iscas tóxicas. Para isso, avaliaram-se nove espécies de plantas: *Croton floribundus*, *C. urucurana*, *Erythrina falcata*, *Eugenia handroana*, *Gymnanthes concolor*, *Myrsine ferruginea*, *Siparuna guianensis*, *Trichilia catigua* e *Zanthoxylum pohlium*. Destes extratos vegetais, *C. floribundus* (casca) e *Z. pohlium* (folha) foram escolhidos para futuros estudos. No segundo bioensaio avaliaram-se as frações (hexânica, de acetato de etila, metanólica e o resíduo das frações), as fases (aquosa e orgânica), e resíduo das fases de *C. floribundus* contra *A. sexdens*. Objetivou-se confirmar a atividade formicida do extrato dessa planta e identificar as substâncias presentes neste extrato que seriam responsáveis por tal atividade biológica. No terceiro bioensaio, avaliaram-se as frações (hexânica, acetato etila, metanólica), as fases (aquosa e orgânica), e resíduo das fases de *Z. pohlium* contra *A. sexdens* e seu fungo simbiote. Além disso, avaliaram-se as frações e as fases de *C. floribundus* sobre *L. gongylophorus*. Objetivou-se avaliar o potencial das frações de *Z. pohlium* para futuro uso em iscas tóxicas sobre *A. sexdens*. Além de avaliar a atividade fungicida das frações de *Z. pohlium* e *C. floribundus* contra *L. gongylophorus*. Nos testes formicidas, a fração acetato etila, fração metanólica e sua fase aquosa de *C. floribundus* apresentaram atividade sobre *A. sexdens*. Da fração acetato isolou-se o ácido caurenóico, porém este não apresentou atividade formicida. A fração metanólica e sua fase aquosa de *Z. pohlium* foram tóxicas a *A. sexdens*. Nos testes com o fungo, o extrato bruto de *C. floribundus* apresentou crescimento fúngico reduzido em 40% se comparado ao DMSO 1000 µL. A fração metanólica de *C. floribundus* e sua fase aquosa potencializaram o crescimento fúngico em 76 e 173%, respectivamente, se comparado ao DMSO 500 µL. No entanto, o DMSO 500 µL e a fração metanólica de *C. floribundus* não formaram gongilídeos, enquanto a fase aquosa observou-se sua formação. A fração acetato e a fase aquosa de *Z. pohlium* estimularam o crescimento do fungo em 57% e 73%, respectivamente, porém nestes tratamentos não foi evidenciado a formação de gongilídeos. No segundo experimento, o crescimento fúngico dos tratamentos foi semelhante com o das testemunhas. No entanto, a fração hexânica e a fase orgânica de *C. floribundus*, e a fração acetato etila e fase aquosa de *Z. pohlium* não apresentaram formação de gongilídeos. Estes substratos apresentaram atividade fungistática em sua produção.

Palavras-chave: Formigas cortadeiras. Extrato de planta. Controle químico. Controle de pragas. Bioensaio de ingestão.

## ABSTRACT

We studied the potential of plant extracts on the control of *Atta sexdens* and its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. This work consisted of three bioassays. At first one, a plant extracts screening was performed to verify the formicide potential offered by a future use of toxic baits intake. Thus, we assessed nine plant species: *Croton floribundus*, *C. urucurana*, *Erythrina falcata*, *Eugenia handroana*, *Gymnanthes concolor*, *Myrsine ferruginea*, *Siparuna guianensis*, *Trichilia catigua*, and *Zanthoxylum pohlianium*. Among these plant extracts, *C. floribundus* (bark) and *Z. pohlianium* (leaf) were chosen for further studies. In the second bioassay we evaluated the fractions (hexane, ethyl acetate, methanol, and residue fractions), the phases (aqueous and organic), and the residue of phases of *C. floribundus* against *A. sexdens*. We aimed to confirm the formicide activity of this plant extract and identify substances present in this extract, which are responsible for such biological activity. In the third bioassay, we evaluated the fractions (hexane, ethyl acetate, methanol), the phases (aqueous and organic), and residual of phases of *Z. pohlianium* against *A. sexdens* and its symbiotic fungus. Besides, we assessed the fractions and phases of *C. floribundus* against *L. gongylophorus*. Here, we investigated the potential of *Z. pohlianium* fractions for future use in toxic baits against *A. sexdens* apart from evaluating the fungicidal activity of *Z. pohlianium* and *C. floribundus* fractions against *L. gongylophorus*. Regarding formicide tests, ethyl acetate fraction, methanolic fraction and its *C. floribundus* aqueous phase showed activity against *A. sexdens*. From ethyl acetate fraction was isolated kaurenoic acid, although it did not show formicide activity. The methanolic fraction and its *Z. pohlianium* aqueous phase were toxic to *A. sexdens*. In tests with the fungus, the rough extract of *C. floribundus* showed fungal growth, which reduced in 40% compared to DMSO (1000 µL). The *C. floribundus* methanolic fraction and its aqueous phase potentiated the fungal growth in 76 and 173%, respectively, compared to DMSO (500 µL). However, the DMSO (500 µL) and *C. floribundus* methanolic fraction did not formed gongylidia, while in the aqueous phase it was present. The ethyl acetate fraction and *Z. pohlianium* aqueous phase promoted fungus growth in 57% and 73%, respectively, but it was not found the gongylidia formation in these treatments. In the second experiment, the fungal growth of treatments were similar compared to the control. Nevertheless, the hexane fraction, the *C. floribundus* organic phase, the ethyl acetate fraction, and the *Z. pohlianium* aqueous phase did not show gongylidia formation. The product of these substrates showed fungistatic activity.

Keywords: Leafcutter ants. Extract plant. Chemical control. Pest Control. Feed intake bioassay.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figure 1	<i>Atta sexdens</i> and its fungal garden: mycelial care (A) .....	27
Figure 2	Microscopic images of <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> , the symbiotic fungus of <i>A. sexdens</i> . (A) Staphylae (arrows) contrasting with the hyphae (50x magnification). (B) Staphylae viewed under an optical microscope: each sphere corresponds to a gongylidia (1,000x magnification). .....	31
Figure 3	Diagram showing the procedure for obtaining crude extracts, fractions, and sub-fractions from sesame seeds ( <i>S. indicum</i> ) and the sequence of topical application on <i>A. sexdens rubropilosa</i> workers .....	45
Figure 4	Chemical structures of the compounds isolated from <i>Virola sebifera</i> , (+)-sesamin (1), (-)-hinoquinin (2), and (-) - kusunokinin (3). .....	51
Figure 5	Limonexic acid isolated from <i>Raulinoa echinata</i> stems .....	53
Figure 6	Compounds identified as skimmianine (5), kokusagine (6), masculine (7), flindersiamine (8), 2-n-Nonyl-4-quinolone (9), 1-Methyl-2-n-nonyl-4-quinolone (10), and 1-Methyl-2-phenyl-4-quinolone (11) based on comparison with spectral data presented in the literature .....	54
Figure 7	Molecular structures of substances from <i>H. puberula</i> : anthranilic acid (12), flindersiamine (13), dictamnine (14), kokusaginine (15), and masculine (16). .....	56
Figure 8	Chemical structures of the sesquiterpenes identified in the most active fraction of the <i>E. maculate</i> leaf extract. ....	58

Figure 9	Chemical structures of substances isolated from <i>Simarouba vesicolor</i> : 4,5-dimethoxycanthin-6-one (19) and 5-methoxycanthin-6-one (20). .....	63
Figure 10	Ricinin (21) isolated from leaf extracts of <i>Ricinus communis</i> .....	67
Figure 11	Structures of the synthesised compounds 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) methane (22); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) ethane (23); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) butane (24); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) hexane (25); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) octane (26); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) decane (27); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) dodecane (28); and the commercial compound piperonyl butoxide (29). .....	69
Figure 12	2-(E)-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propenamide group.....	70
Figure 13	Synthesis of amides 1-9.....	71
Figure 14	Colonisation of freshly cut leaves by <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> . Panel A: LF—leaf fragment; HM—hyphal mass. Magnification: ×100. Panel B: St—stomata; CL—cut leaf edge exposing mesophyll tissue. Magnification: ×200. Panel C: H—hyphae; LS—leaf surface. Magnification: ×1000. Panel D: CL—cut leaf edge; MS—exposed mesophyll tissue. Magnification: ×200.....	73
Figure 15	Larvae of <i>A. sexdens</i> expelling a droplet of proctodeal liquid (A). After touching the antenna, an <i>A. sexdens</i> worker immediately proceeds to ingest the proctodeal liquid by licking the larva's anus with its glossa (arrow) (B).....	76

## CAPÍTULO 2

- Figura 1 Toxicidade do extrato vegetal de *Croton floribundus* (folha) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica ..... 103
- Figura 2 Toxicidade do extrato vegetal de *Croton floribundus* (casca) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica ..... 104
- Figura 3 Toxicidade do extrato vegetal de *Croton urucurana* (folha) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica ..... 106
- Figura 4 Toxicidade do extrato vegetal de *Eugenia handroana* (folha) (Myrtaceae) oferecidos via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica ..... 107
- Figura 5 Toxicidade do extrato vegetal de *Erythrina falcata* (casca) (Fabaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica ..... 109
- Figura 6 Toxicidade do extrato vegetal de *Gymnanthes concolor* (folha) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica ..... 110

Figura 7	Toxicidade do extrato vegetal de <i>Trichilia catigua</i> (casca) (Meliaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	111
Figura 8	Toxicidade do extrato vegetal de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (folha) (Rutaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	112
Figura 9	Toxicidade do extrato vegetal de <i>Myrsine ferruginea</i> (casca) (Myrsinaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	113
Figura 10	Toxicidade do extrato vegetal de <i>Siparuna guianensis</i> (folha) (Siparunaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	114

### **CAPÍTULO 3**

Figura 1	Toxicidade da fração acetato de etila de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	144
Figura 2	Toxicidade da fração metanólica de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	145

Figura 3	Toxicidade da fase aquosa de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	146
Figura 4	Toxicidade da fração hexano de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	148
Figura 5	Toxicidade do resíduo da fração hexano de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	148
Figura 6	Toxicidade do resíduo da fração hexano de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	149
Figura 7	Toxicidade do resíduo da fase aquosa de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	150
Figura 8	Toxicidade do resíduo das fases de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	151

Figura 9	Toxicidade do ácido caurenóico isolado da fração acetato etila de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	152
----------	--	-----

#### CAPÍTULO 4

Figura 1	Toxicidade da fração metanólica de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Rutaceae) oferecido via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	186
Figura 2	Toxicidade da fração hexano de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Rutaceae) oferecidos via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	187
Figura 3	Toxicidade da fração acetato etila de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Rutaceae) oferecidos via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	188
Figura 4	Toxicidade da fração acetato etila de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Rutaceae) oferecidos via ingestão para operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica .....	189
Figura 5	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Testemunha sem solvente; (B) DMSO 1000 µL.....	190

- Figura 6 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Extrato Bruto *Croton floribundus* (C.f.) (1 mg.mL<sup>-1</sup>) e (B) Extrato Bruto *Zanthoxylum pohlianum* (Z.p.) (1 mg.mL<sup>-1</sup>)..... 191
- Figura 7 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Testemunha DMSO 500 µL; (B) Fração Metanólica de *C. floribundus* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) e (C) Fração Aquosa de *C. floribundus* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>)... 195
- Figura 8 Fotos do crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Fração Metanólica de *Z. pohlianum* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) e (B) Fração Aquosa de *Z. pohlianum* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) ..... 196
- Figura 9 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Fração Hexano *C.f.* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>); (B) Resíduo da Fração Hexano *C.f.* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>); (C) Fração Acetato etila *C.f.* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>)..... 198
- Figura 10 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Resíduo da Fração Acetato *C.f.* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>); (B) Fase Orgânica *C.f.* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>); (C) Fração Hexano *Z.p.* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) ..... 199

Figura 11	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em diferentes substratos , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Fração Metanólica Z.p. (0,3 mg.mL <sup>-1</sup> ); (B) Fração Orgânica Z.p. (0,3 mg.mL <sup>-1</sup> ).....	200
Figura 12	Fotos do crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Testemunha sem solvente; (B) DMSO 1000 µL.....	201
Figura 13	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	203
Figura 14	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	205
Figura 15	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	206
Figura 16	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	207



Figura 17	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	208
Figura 18	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	209
Figura 19	Crescimento fúngico de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em meio de cultura , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbionte, (2) lâmina dos gongilídeos .....	210

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1	Plant species with toxic effects against leaf-cutting ants and/or their symbiotic fungi and the associated isolated substances .....	35
Table 2	Antifungal activity of sesame leaf extracts .....	39
Table 3	Antifungal activity of chloroform extracts of sesame leaves, fruits, and seeds at different stages of development.....	40
Table 4	Fungal growth (%) of <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> in culture medium containing different concentrations [mg/mL] of the hexane, dichloromethane, and methanol extracts from sesame. Control= (100).....	42
Table 5	Toxicity of SD-E sub-fraction combinations in <i>Atta sexdens</i> workers.....	46
Table 6	Toxicity of SD-E sub-fraction combinations in <i>Atta sexdens</i> workers.....	49
Table 7	Fatty acids found in <i>C. ensiformis</i> .....	52
Table 8	Evaluation of the growth inhibitory activity of crude extracts, fractions, and compounds of <i>R. Echinata</i> .....	55
Table 9	Mortality (%) of <i>Atta sexdens</i> workers fed on compounds 1-11 at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	60
Table 10	Toxicity (% mortality and $S_{50}$ ) of substances isolated from <i>Simarouba versicolor</i> in <i>Atta sexdens</i> workers .....	64
Table 11	Activity of fatty acids present in the methanol fraction of hexane extracts from <i>Ricinus communis</i> leaves (MFHE) against <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	66

Table 12 Amines, the respective yields of the amides, and the eluents used in the chromatographic separation. ....	71
--	----

## **CAPÍTULO 2**

Tabela 1 Tempo letal mediano (TL <sub>50</sub> )*, concentração utilizada, valores de $\alpha$ e $\beta^{**}$ e Mortalidade (%) de operárias de ( <i>Atta sexdens rubropilosa</i> ) submetidas aos bioensaios de ingestão de diferentes extratos vegetais de plantas .....	100
--	-----

## **CAPÍTULO 3**

Tabela 1 Massa das Frações e Fases obtidas a partir do extrato bruto metanólico de <i>Croton foribundus</i> , rendimento das frações ou fase em relação ao total do extrato bruto e massa total utilizada para avaliar a atividade formicida contra <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em testes via ingestão .....	137
Tabela 2 Concentração da pasta oferecida, Tempo letal mediano (TL <sub>50</sub> )*, Valores de $\alpha$ e $\beta^{**}$ , e mortalidade acumulada (%) de operárias médias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas a bioensaios de ingestão utilizando as frações solúveis em hexano, acetato de etila e metanol de <i>C. floribundus</i> , e as fases orgânica, aquosa e resíduo obtidas a partir da fração metanólica .....	141

## **CAPÍTULO 4**

Tabela 1 Massa das frações e fases obtidas a partir do extrato bruto metanólico de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> , rendimento das frações ou fase em relação ao extrato bruto e massa total utilizada para avaliar a atividade formicida contra <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em testes via ingestão .....	177
---	-----

Tabela 2	Concentração dos Extratos brutos, Frações e Fases de <i>Croton floribunduse Zanthoxylum pohlianum</i> utilizada nos testes fungicidas contra o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	181
Tabela 3	Concentração, Tempo Letal Mediano (TL <sub>50</sub> )*, Valores de $\alpha$ e $\beta^{**}$ , e Mortalidade Acumulada (%) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas a bioensaios de ingestão utilizando as frações solúveis em hexano, acetato de etila e metanol de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> , e as fases orgânica, aquosa e resíduo obtidas a partir da fração metanólica.....	184
Tabela 4	Crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> na presença de extratos brutos e frações de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Z.p.) e <i>Crotonfloribundus</i> (C.f.) (Média em cm $\pm$ Erro Padrão) .....	192
Tabela 5	Crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> repicado em meio de cultura após ter crescido na presença do meio de cultura com os extratos brutos ou frações de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Z.p.) e <i>Croton floribundus</i> (C.f.) (Média em cm $\pm$ Erro Padrão).....	202

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução Geral</b> .....	22
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	26
<b>3.1</b>	<i>Introduction - Leaf-cutting</i> .....	26
<b>3.2</b>	<i>Leaf-cutting ants of the genera Atta and Acromyrmex and their symbiotic fungus, Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	29
<b>3.3</b>	<i>Plants toxic to leaf-cutting ants and their symbiotic fungi</i> .....	34
<b>3.3.1</b>	<i>Sesamum indicum</i> .....	38
<b>3.3.2</b>	<i>Virola sebifera</i> .....	50
<b>3.3.3</b>	<i>Canavalia ensiformes</i> .....	51
<b>3.3.4</b>	<i>Raulinoa echinata</i> .....	52
<b>3.3.5</b>	<i>Helietta puberula</i> .....	55
<b>3.3.6</b>	<i>Eucalyptus sp.</i> .....	56
<b>3.3.7</b>	<i>Cedrela fissilis</i> .....	58
<b>3.3.8</b>	<i>Azadiracta indica</i> .....	60
<b>3.3.9</b>	<i>Simarouba versicolor</i> .....	62
<b>3.3.10</b>	<i>Ageratum conyzoides</i> .....	64
<b>3.3.11</b>	<i>Ricinus communis</i> .....	65
<b>3.3.12</b>	<i>Synthetic analogues of plant origin</i> .....	67
<b>3.4</b>	<i>Control of leaf-cutting ants via enzymatic inhibition</i> .....	72
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	78
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	79
	<b>REFERENCES</b> .....	80
	<b>CAPÍTULO 2 Toxicidade de extratos vegetais para <i>Atta sexdens rubropilosa</i> F. (Hymenoptera: Formicidae)</b> .....	90
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	92
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	95
<b>2.1</b>	<i>Preparo dos extratos</i> .....	95
<b>2.2</b>	<i>Bioensaio com as formigas cortadeiras</i> .....	96
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	99
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	115
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	119
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	120
	<b>CAPÍTULO 3 Avaliação da toxicidade das frações e composto isolado de <i>Croton floribundus</i> Spreng. (Euphorbiaceae) sobre <i>Atta sexdens rubropilosa</i> Linnaeus (Formicidae)</b> .....	124

1	INTRODUÇÃO .....	126
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	129
2.1	Coleta do material botânico e preparo do extrato bruto .....	129
2.2	Fracionamento das frações do extrato bruto metanólico solúveis em hexano, acetato de etila e metanol .....	130
2.3	Partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato bruto metanólico de <i>Croton floribundus</i> .....	131
2.4	Fracionamento por cromatografia em coluna da fração solúvel em acetato de etila (FACoet) do extrato bruto metanólico (EBMeOH) .....	132
2.5	Fracionamento das amostras G-38-02 e G-38-03 proveniente da FACoet .....	132
2.6	Fracionamento da amostra G-79-02 proveniente da FACoet .....	133
2.7	Identificação das substâncias purificadas .....	133
2.8	Experimentos com formigas realizados em condições de laboratório .....	134
3	RESULTADOS .....	140
4	DISCUSSÃO .....	153
5	CONCLUSÃO .....	157
	REFERÊNCIAS .....	158
	<b>CAPÍTULO 4 Avaliação da toxicidade das frações de <i>Zanthoxylum pohlianum</i> (Rutaceae) em operárias de <i>Atta sexdens</i> (Formicidae) e de <i>Croton floribundus</i> (Euphorbiaceae) e <i>Zanthoxylum pohlianum</i> sobre o seu fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> (Agaricaceae) .....</b>	<b>163</b>
1	INTRODUÇÃO .....	167
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	170
2.1	Obtenção do extrato bruto de <i>Croton floribundus</i> e <i>Zanthoxylum pohlianum</i> .....	170
2.2	Fracionamento do extrato vegetal de <i>Croton floribundus</i> e <i>Zanthoxylum pohlianum</i> .....	171
2.3	Partição Líquido-líquido dos extratos metanólicos de <i>Croton floribundus</i> e <i>Zanthoxylum pohlianum</i> .....	172
2.4	Experimentos em condições de laboratório .....	173
2.4.1	Teste formicida .....	173
2.4.2	Teste fungicida .....	179
3	RESULTADOS .....	183
3.1	Teste formicida .....	183
3.2	Teste fungicida .....	190
4	DISCUSSÃO .....	211
5	CONCLUSÃO .....	215
	REFERÊNCIAS .....	216

## **CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

### **1 INTRODUÇÃO**

As formigas cortadeiras são as principais pragas de florestas cultivadas no Brasil (ANJOS et al., 1993). Os vegetais frescos obtidos nas atividades de forrageamento das formigas são utilizados para o desenvolvimento do fungo simbiote e para sua própria alimentação. O fungo constitui a única fonte de alimento para as larvas das formigas, além de fornecer 9% da energia necessária para os indivíduos adultos (BASS; CHERRETT, 1995).

O controle destes insetos tem sido realizado, quase exclusivamente, com a aplicação de inseticidas convencionais, entre eles, piretróide, neonicotinóide, carbamato, fenilpirazol e sulfona fluoralifática (BRASIL, 2010), que podem provocar impactos ao ambiente e ao homem, além de acarretar considerável aumento no custo da produção agroflorestal nacional. Esses princípios ativos vêm sofrendo restrições de governo e órgãos certificadores de florestas plantadas. Esses certificadores permitem o uso dessas iscas desde que atendidas as seguintes recomendações: identificar as espécies de formigas cortadeiras causadoras de danos; estabelecer o nível de dano econômico, monitorar e localizar áreas infestadas por elas; reduzir a quantidade de iscas para o mínimo necessário para o efetivo controle; usar métodos de controle alternativos, como extratos de plantas, fungos, feromônios, etc; aplicar as iscas preferencialmente em embalagens (porta-iscas) ou micro porta-iscas (mipis); manter registros sobre todas as atividades envolvidas no controle as formigas cortadeiras, incluir essa informação nos relatórios de gestão florestal e identificar a época e o horário do dia em que as formigas são mais ativas em relação a atividade de forrageamento. Neste caso, será possível aplicar iscas durante o período de maior atividade, garantindo a maior coleta de iscas pelas formigas cortadeiras, melhorando a

eficiência em relação ao consumo de iscas, evitando assim a contaminação de organismos não-alvo.

Dessa forma, é necessário desenvolver pesquisas para atender essa demanda, como a obtenção de óleos essenciais e extratos vegetais que apresentem efeito tóxico as formigas cortadeiras. As substâncias extraídas de compostos naturais podem causar mortalidade de formigas cortadeiras, como observado com óleos de sementes de citros (Rutaceae) (FERNANDES et al., 2002) e extratos de mamona (*Ricinus communis*) (Euphorbiaceae) (BIGI et al., 2004), timbó (*Ateleia glazioviana*) (Leguminosae) (CANTARELLI et al., 2005) e eucalipto (*Eucaliptus urophylla*) (Myrtaceae) (LACERDA et al., 2010). Além disso, os compostos em doses subletais podem interferir no comportamento das formigas, como observado com o  $\beta$ -eudesmol extraído de folhas de eucalipto (MARINHO et al., 2005, 2008; MARSARO JUNIOR et al., 2004). Esse sesquiterpeno foi capaz de modificar a composição química da cutícula das operárias, prejudicando o reconhecimento entre operárias provenientes do mesmo ninho, desencadeando comportamento de alarme e de agressão (MARINHO et al., 2008).

Além da atividade formicida, os produtos naturais também podem ser tóxicos ao fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*), constituindo outra forma de controle. Esse efeito já foi constatado com extratos de *R. communis* (BIGI et al., 2004), *Helietta puberula* (Rutaceae) (ALMEIDA et al., 2007) e *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) (PEÑAFLORES et al., 2009).

O potencial inseticida de diversas plantas tem sido avaliado pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFLA, em relação a essa praga, observando-se resultados promissores com algumas espécies. A ação inseticida de 405 extratos de plantas do Cerrado de Minas Gerais foi avaliada sobre operárias de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Observou-se que, quando aplicados os extratos via ingestão de



dieta contaminada, em estado preliminar os extratos vegetais de *Erythrina falcata* (Fabaceae), *Trichilia catigua* (Meliaceae), *Myrsine ferruginea* (Myrsineae), *Eugenia handroana* (Myrtaceae) e *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae), apresentaram efeito formicida. Para dar continuidade a tal trabalho faz-se necessário isolar e identificar as substâncias com propriedades formicida presentes nestes extratos vegetais citados.

## 2 OBJETIVOS

- a) Avaliar, em condições de laboratório, a toxicidade de extratos vegetais previamente selecionados e suas frações em diferentes concentrações, oferecidos via ingestão a operárias de *Atta sexdens rubropilosa* para possível uso em iscas tóxicas;
- b) Purificar e identificar as substâncias ativas presentes naqueles extratos vegetais que apresentaram ação formicida;
- c) Avaliar a toxicidade dos extratos vegetais que apresentaram potencial formicida, sobre o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Introduction<sup>1</sup> - Leaf-cutting*

Leaf-cutting ants of the genera *Atta* sp. Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) and *Acromyrmex* sp. Mayr (Hymenoptera: Formicidae) are among the best known species of the family Formicidae in the New World, mainly due to their behaviour of cutting live plants to grow the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales: Agaricaceae) (Figure 1) (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011). This interaction, which emerged more than 50 million years ago (SILVA-PINHATI et al., 2004), has evolved to such a complex level that the ants and fungi cannot survive separately; they live in symbiosis. The fungus supplies the ants with nutrients obtained from metabolising plant materials that can be easily assimilated. In exchange, its environment is highly protected by the ants, which remove contaminants and secrete antibiotics from their metapleural glands (MOREIRA; ERTHAL JUNIOR; SAMUELS, 2011; VIEIRA; BUENO; CAMARGO-MATHIAS, 2010)..

The symbiotic fungus, which exhibits high carbohydrate and protein content but low content, constitutes the main food source for leaf-cutting ant colonies (MARTIN et al., 1969), and is the single nutrient source for the queen, larvae, and temporary alate castes. Only 9% of the energy requirements of adult workers, which ingest plant sap when handling plant fragments, are obtained from the fungus (BASS; CHERROTT, 1995). Moreover, the symbiotic fungus

---

<sup>1</sup> **Revisão de literatura ADAPTADA** de: SANTOS, J. C. et al. Plant-derived products for leaf-cutting ants control. In: TRDAN, S. (Ed.). **Insecticides**: development of safer and more effective technologies. Hard Cover: InTech, 2013. chap. 8.

produces large amounts of enzymes, which are ingested by the ants and are returned to the fungal garden through faecal liquid to facilitate the digestion of plant tissue (RONHEDE; ROSENDAHL, 2004; SILVA et al., 2003).

Leaf-cutting ants are considered the main agricultural and forest pest in countries such as Brazil, as they attack plants at any stage of their development, cutting their leaves, flowers, buds, and branches, which are then transported to the interior of their underground nest (MARICONI, 1981). A colony of *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae) can cut approximately 5 kg of plant material/day (JAFFÉ, 1993). Thus, these ants cause direct losses, such as the death of seedlings and reduction of tree growth. Indirect losses also occur as a result of the decreased resistance of trees to other insects and pathogenic agents (ZANUNCIO et al., 1996).



Figure 1 *Atta sexdens* and its fungal garden: mycelial care (A)

Source: Photo by Arnhold (2012)

Leaf-cutting ant control has been performed almost exclusively through the application of conventional insecticides, including cyfluthrin (pyrethroid), imidacloprid (neonicotinoid), furathiocarb (carbamate), sulfluramid (fluoroaliphatic sulfonamide), and fipronil (phenyl pyrazole) (BRASIL, 2010). Due to the problems these products may cause to the environment and humans, their use has been restricted by governments and forest product certification bodies, which have demanded and encouraged the development of alternative control strategies to these insecticides, such as the use of plant-derived products, entomopathogenic fungi, and pheromones (ISENRING; NEUMEISTER, 2011).

Plant-derived products can be used to control ant populations through several mechanisms. Some of these substances can act directly against the ant, leading to its death, such as citrus seed oils obtained from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm. f. or *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae) (FERNANDES et al., 2012), and extracts from the castorbean (*Ricinus communis* L.) (Euphorbiaceae) (BIGI et al., 2004), timbo (*Ateleia glazioviana* Baill.) (Leguminosae) (CANTARELLI et al., 2005) and eucalyptus (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake) (Myrtaceae) (LACERDA et al., 2010). Certain plant-derived substances can promote aggressive behaviour of ants towards their sisters, as reported for  $\beta$ -eudesmol extracted from eucalyptus leaves (MARINHO et al., 2005, 2008; MARSARO JUNIOR et al., 2004). This sesquiterpene is able to modify the chemical composition of the worker's cuticle, impairing nest recognition, which triggers warning and aggressive behaviours among ants (MARINHO et al., 2008). Plant extracts can also be toxic to the symbiotic fungus (*L. gongylophorus*), which represents an interesting target for new products for ant control. Such effects can be observed for extracts of *R. communis*, *Helietta puberula* R.E.Fr. (Rutaceae), *Simarouba versicolor* St. Hill (Simaroubaceae), and *Canavalia ensiformis* (L.) DC.

(Fabaceae) (ALMEIDA et al., 2007; BIGI et al., 2004; PENÑAFLORES et al., 2009; VALDERRAMA ESLAVA; MONTROYA-LERMA; GIRALDO, 2009).

### ***3.2 Leaf-cutting ants of the genera Atta and Acromyrmex and their symbiotic fungus, Leucoagaricus gongylophorus***

Leaf-cutting ants comprise over 12,000 species and are considered social insects because they participate in parental care, reproductive castes, overlapping generations, and a division of labour (WILSON, 1971). These insects live in permanent colonies and are holometabolous. Taxonomically, they belong to the order Hymenoptera, family Formicidae, subfamily Myrmecinae, and tribe Attini (HÖLLDOBLER, 1990). Leaf-cutting ants belong to the genera *Atta* Fabricius and *Acromyrmex* Mayr as well as the basal genera *Apterostigma* Mayr, *Kalathomyrmex* Klingenberg and Brandão, *Mycetagroicus* Brandão and Mayhé-Nunes, *Mycetarotes* Emery, *Mycetaphylax* Fr. Smith, *Paramycetophylax* Kusnezov, *Sericomyrmex* Mayr, *Trachymyrmex* Forel, *Pseudoatta* Gallardo, and *Attaichnus* Lazã (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011). The Attini tribe is found only in the Neotropical region and is distributed between southern South America and the southern United States (LOECK; GRUTSMACHER, 2003).

The leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (known as *saiúvas* and *quenquéns* in Brazil, respectively) build nests composed of hundreds of underground chambers that are connected to each other and to the surface through galleries. The exterior of the nest usually exhibits a loose soil mound originating from the chambers formed by the nest (GONÇALVES, 1964). Holes can be found in the loose soil mound or outside of it. According to Mariconi (1970), a large anthill of approximately 200 m<sup>2</sup> may contain an estimated population of six million ants.

Leaf-cutting ants cultivate the symbiotic fungus *L. gongylophorus*, which is used as a source of food and of auxiliary enzymes that function in the ants digestive process (HÖLLDOBLER; WILSON, 2008). After the origination of the ant-fungus symbiosis, a subsequent evolutionary step involved the acquisition of staphylae-rich monophyletic cultivars by the highly derived Attini (Figure 2), particularly the *Atta* and *Acromyrmex* species, which collect only fresh vegetation as the fungal substrate. The conversion of vegetation into substrate requires several different operations and specialisations. The plants are cut by workers who have a head width of 1.6 mm or greater (other tasks, such as defence, involve larger workers), while care of the fungus requires very small workers, and intermediary steps in the garden are performed by medium-sized workers. Among ant species, this great evolutionary change seems to have placed the derived Attini on the path of producing larger and larger colonies due to the increased differences between the sizes of reproductive females and workers. Relatively larger reproductive ants show an increased ovariole count, enabling rapid colony growth (VILLESEN et al., 2002), which, due to the increased size variation among nestmate workers, are able to execute all activities involved in fungal cultivation.

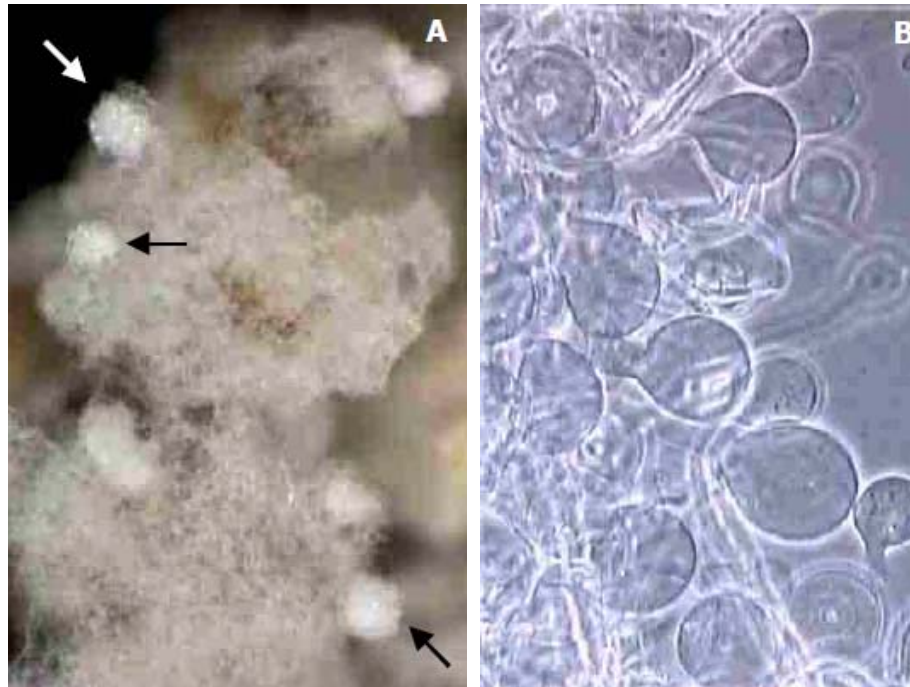


Figure 2 Microscopic images of *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of *A. sexdens*. (A) Staphylae (arrows) contrasting with the hyphae (50x magnification). (B) Staphylae viewed under an optical microscope: each sphere corresponds to a gongylidia (1,000x magnification)

Source: (SHNEIDER, 2003).

Leaf-cutting ants from the genera *Atta* and *Acromyrmex* are the only ants within the group Attini that exhibit polyandry (DELLA LUCIA; VILELA, 1993). The development of this behaviour in the Attini coincided with the practice of cutting the leaves and live parts of plants (VILLESEN et al., 2002). The use of leaves, which are a widely available resource, would have allowed the leaf-cutting ants to achieve large colonies, leading to the appearance of long-lived queens and more complex forms of social organisation. Polyandry could



favour the development of disease resistance as it increases the genetic diversity of the colony (HUGLES et al., 2008).

The consecutive matings between *Atta* and *Acromyrmex* species occur at the regional level throughout Brazil. In the southeast region, the nuptial flight of *Atta* species occurs between October and December; during this period, adult nests (approximately 38 months old) produce alate and fertile ants, and during the nuptial flight, referred to as swarming, the males fertilise the females (DELLA LUCIA; VILELA, 1993). When leaving the nest for the nuptial flight, the virgin queen carries a small fragment of mycelium in her infrabuccal pocket to start a new fungus garden in a new nest (MARICONI, 1970). After mating, the reproductive females walk on the soil surface, remove their wings and search for a site to begin the excavation of the new nest (FORTI et al., 2011). In general, 48 hours after the excavation of the initial chamber (MARICONI, 1970), the future queen regurgitates the fungal fragment from her infrabuccal pocket. When starting the new colony, this small portion of the fungus is sterilised and fertilised with faecal droplets. Five to six days after the beginning of nest excavations, the queen begins oviposition (MARINHO et al., 2011). The queen in a new colony lays both reproductive and trophic eggs, which are used as a food source for both the queens and their first offspring (AUTUORI, 1956). Early larvae originating from the reproductive eggs emerge 24 to 25 days after soil excavation by the queen. Ant larvae have been described as the digestive caste of the colony (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) and can actively contribute to the integration of the colony not only as a source of new adults but also by providing nutrients and enzymes for the workers, thus ensuring that the larvae will be cared for, which is essential for their survival. At 62 to 66 days after the nuptial flight, the first adults emerge, which feed on sap or obtain liquid food through trophallaxis or regurgitation (MARINHO et al., 2011). On average, 87 days pass between the initial excavation and the appearance of the first

opening created by workers. The second opening is only built 14 months after the first one. Additional openings appear quickly; on average, after 82 days, eight openings are present. The tenth opening is created approximately 20 months after the colony is fertilised. When the nest reaches three years of age ( $\pm 38$  months), it reaches adulthood and produces the first nuptial flight (ZANETTI et al., 2002).

The use of plants as a substrate for the growth of the symbiotic fungus has led these ants to become the main pest on Brazilian forest plantations, despite playing a very important ecological role (ANJOS et al., 2008; ARAÚJO; DELLA LUCIA; SOUSA, 2003; ZANETTI; ZANUNCIO, 2005). Leaf-cutting ants remove and modify the soil during the nest construction process, promoting changes in the chemical-physical properties of the soil and nutrient cycling that are favourable to plant growth (FORTI et al., 2011). However, their position as a key pest is generally cited more often due to the large quantities of vegetation these ants collect for growing the symbiotic fungus.

Leaf-cutting ants show a preference for certain plant species, which are consistently defoliated, while other species are not attacked, despite being abundant and located close to their nests. Some ant species attack only dicotyledonous plants, others target monocotyledons, and some ants collect both plant types. The preference for particular plant species may be related to the nutritional demands of the symbiotic fungus *L. gongylophorus* grown by these ants (BORBA et al., 2006). Ants can attack plants at any stage of their development, cutting their leaves, flowers, buds, and thin branches, which are then transported to the interior of their underground nests (ANDRADE et al., 2002; GARCIA et al., 2003).

The complete defoliation of one-month-old *Pinus taeda* L. causes 25% mortality of these plants. For the plants that survive, defoliation affects their diameter more than their height (REIS FILHO et al., 2011). Previous studies have demonstrated that there is a significant reduction in the development of *P. taeda* during the first 24 months of life when attacked by leaf-cutting ants (CANTARELLI et al., 2008). Total defoliation reduces the growth of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden in both diameter and height as well as the profit of the producer at the end of the rotation, even if the defoliation occurs only once during the beginning of the planting. The decreases in production and profits are enhanced according to the frequency of defoliation, which can make the maintenance of totally defoliated areas economically unviable. The damage caused by ants is more harmful to the plants in their first three years. A single total defoliation event delays the growth of the plant (MATRANGOLO et al., 2010), while two or three consecutive defoliation events may lead to plant death (LEWIS; NORTON, 1973; MENDES FILHO, 1979).

Due to the damage they cause, control of these pests is essential to avoid large losses in agricultural and forest crops (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

### ***3.3 Plants toxic to leaf-cutting ants and their symbiotic fungi***

Plants exhibit several mechanisms to prevent herbivory, including producing alcohols, aldehydes, esters, phenols, and hydrocarbons, among other substances, which can be classified as secondary metabolites and can be toxic to leaf-cutting ants and/or their symbiotic fungi. As a result, many studies have been conducted in this field using different plant families, as listed in Table 1; some of these studies are described in more detail below.

Table 1 Plant species with toxic effects against leaf-cutting ants and/or their symbiotic fungi and the associated isolated substances

Plant species	Family	Identified substance	Reference
<i>Hymenaea courbaril</i>	Fabaceae	caryophyllene epoxide	Hubbel, Wiemer e Adejare(1983)
<i>Sesamum indicum</i>	Pedaliaceae	sesamin and/or sesamolin	Morini et al. (2005), Pagnocca et al. (1990, 1996a), Peres Filho and Dorval (2003) and Ribeiro et al.(1998)
<i>Canavalia ensiformes</i>	Fabaceae	Fatty acids; canavalin, canatoxin	Hebling et al. (2000) and Monteiro et al. (1998)
<i>Pilocarpus grandiflorus</i>	Rutaceae	Vanillic acid, syringaldehyde	Godoy et al.(2002)
<i>Eucalyptus maculata</i>	Myrtaceae	elemol, $\beta$ -eudesmol	Marinho et al. (2005, 2006, 2008) and Marsaro Junior et al. (2004)
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	Palmitic acid; ricin	Bigi et al. (2004) and Caffarini et al. (2008)
<i>Dimorphandra mollis</i>	Fabaceae	Astilbin	Cintra et al.(2005)
<i>Raulinoa echinata</i>	Rutaceae	Limonoid, limonexic acid	Biavatti et al.(2005)

“Table 1, continue”

Plant species	Family	Identified substance	Reference
<i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae	3 $\beta$ -acetoxycarapine limonoid, oleanolic acid, oleanic acid, cipadesin A, ruageanin A, cipadesin, khayasin T, febrifugin, mexicanolide	Bueno et al. (2005) and Leite et al. (2005)
<i>Carapa guianensis</i>	Meliaceae	6 $\alpha$ -acetoxygedunin	Ambrozin et al. (2006)
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Azadirachtin	Brugger et al.(2008) and Santos-Oliveira et al.(2006)
<i>Helietta puberula</i>	Rutaceae	kokusagine, anthranilic acid, dictamnine	Almeida et al.(2007)
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae	-	Ribeiro et al.(2008)
<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	-	Ribeiro et al.(2008)
<i>Simarouba versicolor</i>	Simaroubaceae	4,5-dimethoxy-canthin-6-one, 5-methoxy-canthin-6-one	Peñaflor et al.(2009)
<i>Citrus</i> sp.	Rutaceae	Xanthyletin	Cazal et al.(2009)
<i>Spiranthera odoratissima</i>	Rutaceae	furoquinolines, 2-arylquinolin-4-one, limonexic acid, limonin	Terezan et al.(2010)
<i>Tithonia diversifolia</i>	Asteraceae	-	Valderrama-Eslava, Montoya-Lerma and Giraldo (2009)

“Table 1, conclusion”

Plant species	Family	Identified substance	Reference
<i>Tabebuia vellosi</i>	Bignoniaceae	-	Souza, Peres Filho and Dorval (2011)
<i>Magonia pubescens</i>	Sapindaceae	-	Souza, Peres Filho and Dorval (2011)
<i>Annona reticulata</i>	Annonaceae	-	Souza, Peres Filho and Dorval (2011)
<i>Amburana acreana</i>	Leguminosae	-	Souza, Peres Filho and Dorval (2011)
<i>Virola sebifera</i> and <i>Virola sp.</i>	Myristicaceae	sesamin and Epigalavrin; (+)- sesamin, (-)-hinoquinin, (-)- kusunokinin	Bicalho et al. (2012) and Pagnocca et al. (1996a)

### 3.3.1 *Sesamum indicum*

Crude extracts of the leaves, fruits, and seeds of sesame, *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae), were tested *in vitro* against the symbiotic fungus (*L. gongylophorus*) of *A. sexdens*, isolated from previously established nests. Bioassays were performed according to methodology developed by Pagnocca et al. (1990, 1996b). The extracts were added to the culture medium described by Pagnocca et al. (1990) until reaching final concentrations between 7.5 and 60 mg/mL. Ten test tubes were used for each sample, with three replicates for leaf extracts and two replicates for the other extracts. Fungal growth was estimated macroscopically based on the surface area and density of the mycelium after 30-35 days of incubation. The control sample received the same amount of solvent, and the relative growth observed was characterised as follows: 5 + = growth equal to the control; 4 + = growth equivalent to 80% of the control; 3 + = growth equivalent to 60% of the control; 2 + = growth equivalent to 40% of the control; and 1 + = growth equivalent to 20% or less of the control. The crude extracts of sesame leaves, fruits, and seeds inhibited the growth of the symbiotic fungus, which suggests that this species produces compounds with antifungal properties (Tables 2 and 3).

Table 2 Antifungal activity of sesame leaf extracts

Solvent	Final concentration (mg leaf dry weigh/mL)	Relative fungal growth (30-35 days)
Chloroform	7.5	5+
	15.0	5+
	30.0	4+
	60.0	2+
Methanol	7.5	5+
	15.0	5+
	30.0	4+
	60.0	2+
Chloroform+Methanol	30.0+30.0	2+
	60.0+60.0	<1+
Water	60.0	>5+

5+=growth identical to control; 4+=growth equivalent to 80% of control; 3+=growth equivalent to 60% of control; 2+=growth equivalent to 40% to control; 1+=growth equivalent to 20% of control of less. Source: Pagnocca et al.(1990).



Table 3 Antifungal activity of chloroform extracts of sesame leaves, fruits, and seeds at different stages of development

Material and developmental stage	Final concentration mg dry weight/mL	Relative fungal growth (30-35 days)
L1 (leaves 30 days old)	60.0	2+
L2 (leaves 60 days old)	60.0	2+
L3a (green leaves 90 days old)	60.0	3+
L3b (yellow leaves 90 days old)	60.0	2+
Gfr (green fruit)	30.0	3+
RFr (ripe fruit)	30.0	2+
GS (green seed)	30.0	2+
RS (ripe seed)	30.0	2+
Control=5+		

Source: Pagnocca et al. (1990)

In another study, Pagnocca et al. (1996b) determined the number of bacteria and yeast in the organic matter within ant colonies reared in the laboratory with *Eucalyptus alba* Reinw. ex Blume (control) or *S. indicum* (experiment). Transparent plastic pots (2.5 L), connected to each other through transparent tubes (1.5 cm of diameter), were used in these bioassays. In this setup, one chamber was used to supply leaves, a second chamber housed the fungal garden (sponge), and the third chamber contained the residues (waste) from the ants. Fresh leaves (10 to 20 grams) were offered at 48-h intervals after

removal of the waste from the previous treatment. In the older sponges in nests treated with *Eucalyptus*,  $1.4 \times 10^5$  bacterial colony forming units/g (CFU/g) were recorded, while the average in the waste deposits reached  $7.3 \times 10^7$  CFU/g. The most probable numbers (MPNs) of yeast per gram of the material analysed were  $1.3 \times 10^5$  and  $2.2 \times 10^4$  MPN/g for older sponges and waste deposits, respectively, while in ant colonies treated with *S. indicum* leaves, these values were  $3.3 \times 10^7$  CFU/g and  $6.7 \times 10^5$  MPN/g. This increase in the numbers of bacteria and yeast led to visible changes in the colouration and humidity of the fungal sponges of nests treated with sesame, which resulted in fungal death.

The application of fractions of the extracts from sesame leaves at a 2.5 mg/mL concentration completely inhibited the development of the symbiotic fungus of the leaf-cutting ants, and 50% inhibition of fungal development was observed for some fractions at a 1.25 mg/mL concentration (RIBEIRO et al., 1998) (Table 4). Chromatographic analysis of the hexanic extracts of leaves revealed the presence of a mixture of tetradecanoic, hexadecanoic, octadecanoic, icosanoic, docosanoic, and 9,12,15-octadecatrienoic acids. Separation of the compounds in the mixture by fractionation resulted in a loss of or decrease in inhibitory activity against the fungus, indicating that the observed inhibition may be a consequence of the joint action of several compounds in the leaves, rather than of a single substance.

Table 4 Fungal growth (%) of *Leucoagaricus gongylophorus* in culture medium containing different concentrations [mg/mL] of the hexane, dichloromethane, and methanol extracts from sesame. Control=(100). Source: Ribeiro et al. (1998).

Fractions	Extracts		
	Hexane	Dichloromethane	Methanol
Hexane	-	[1.25]/(90)	[1.25]/(60)
	-	[2.50]/(NG)	[2.50]/(NG)
	[5.00]/50	[5.00]/(NG)	[5.00]/(NG)
Dichloromethane	-	[1.25]/(50)	-
	-	[2.50]/(NG)	-
	[5.00]/(90)	[5.00]/(NG)	[5.00]/(10)
Ethyl Acetate	[1.25]/(50)	[1.25]/(50)	[1.25]/(70) <sup>2</sup>
	[2.50]/(NG)	[2.50]/(NG)	[2.50]/(NG)
	[5.00]/(NG)	[5.00]/(NG)	[5.00]/(NG)
Methanol	[1.25]/(90)	[1.25]/(70)	[1.25]/(50) <sup>2</sup>
	[2.50]/(NG)	[2.50]/(NG)	[2.50]/(NG)
	[5.00]/(NG)	[5.00]/(NG)	[5.00]/(NG)
Acetic Acid	[1.25]/(100)	[1.25]/(100)	[1.25]/(100) <sup>2</sup>
	[2.50]/(40)	[2.50]/(NG)	[2.50]/(NG)
	[5.00]/(10)	[5.00]/(NG)	[5.00]/(NG)

<sup>1</sup>Thirty days of incubation/25°C; <sup>2</sup>dry mix; NG=no growth

Extracts from ripe sesame seeds were tested to investigate their toxicity through contact with *A. sexdens* workers. Ripe seeds of *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) were triturated and pressed, yielding sesame butter. A known mass of this sesame butter was macerated for three days three times at room

temperature and then extracted with solvents of increasing polarity (dichloromethane and methanol), resulting in a dichloromethane crude extract (SD) and a methanol crude extract (SM). The SD crude extract was subjected to liquid chromatography in a vacuum synthesised plate funnel with silica gel as the stationary phase and eluents of increasing polarity, which yielded the following fractions: hexane (SD-H), dichloromethane (SD-D), ethyl acetate (SD-E), and methanol (SD-M). The SD-E fraction was produced through successive chromatographic columns, with silica as the stationary phase and hexane/dichloromethane/ methanol as the eluent, in gradient mode. A total of 11 sub-fractions were obtained from this process, only four of which (A, B, C, D) contained a sufficient amount of material to be tested. At the tested concentrations, the same proportion as in the original SD-E fraction was maintained in the sub-fractions, and samples at double these concentrations were also tested (Figure 3). The SD-E sub-fractions were combined in amounts necessary to equal that of the original fraction. The seven sub-fractions (E-K) that were isolated in only small amounts were not tested. Tests were also performed in which the concentration of each sub-fraction was reduced by 50% in two combinations: A+B+C+D and A+B+C. To identify the compounds present in SD-E, hydrogen nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and gas chromatographymass spectrometry (GC-MS) were used. The results demonstrated that *A. sexdens* workers that received the crude dichloromethane extract from sesame seeds (SD) on their *pronoto* exhibited high mortality. This crude extract was then fractionated, and the ethyl acetate fraction (SD-E) was found to be responsible for the toxic effect. However, no toxicity was observed when the SD-E sub-fractions (A, B, C, and D) were tested in the same proportions as found in the original fraction (Table 5). These results could be explained by three hypotheses: 1) each isolated subfraction is only toxic at concentrations above the concentration found in the ethyl acetate fraction; 2) the

sub-fractions are only toxic when combined through a synergistic effect between their components; and 3) toxic compounds are present in the untested sub-fractions (E-K), which corresponded to 26.77% of the ethyl acetate fraction. Experiments were conducted to determine why the formicidal activity was lost. First, the authors doubled the concentration of each sub-fraction, and only one fraction, composed of triglycerides, was found to be toxic (Table 5). Then, when sub-fractions A, B, C, and D were combined, the formicidal effect reappeared, even at concentrations reduced to 50% of the original concentration (Table 6). A mixture containing 73.23% (A + B + C + D) of the ethyl acetate fraction contains chemical compounds that reduce the survival of *A. sexdens* (MORINI et al., 2005).

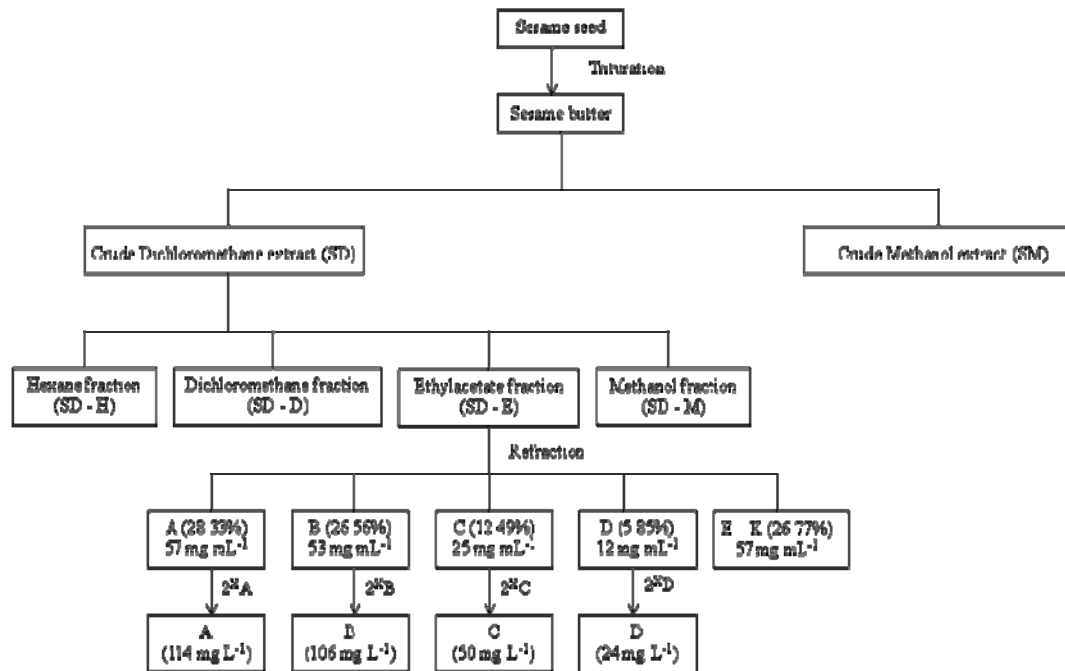


Figure 3 Diagram showing the procedure for obtaining crude extracts, fractions, and sub-fractions from sesame seeds (*S. indicum*) and the sequence of topical application on *A. sexdens rubropilosa* workers

Source: Morini et al. (2005)

Table 5 Toxicity of SD-E sub-fraction combinations in *Atta sexdens* workers

Material	Concentration (mg mL <sup>-1</sup> )	% Mortality/Day										S <sub>50</sub>
		1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Control D	-	0	0	2	10	35	53	72	90	93	100	10a
SD	200	2	7	18	47	73	90	93	95	97	100	7c
SM	200	3	10	17	45	67	75	87	90	97	100	7c
Control H	-	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
SD H	200	8	53	63	77	85	88	88	92	97	100	2c
Control D	-	5	5	15	37	62	78	85	97	97	100	7b
SD-D	200	0	5	5	27	53	63	78	82	92	100	8a
Control E	-	2	3	5	27	58	68	88	95	97	100	8a
SD-E	200	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
Control M	-	27	47	57	67	70	75	88	93	100	-	3c
SD-M	200	0	5	5	27	53	63	78	82	92	100	8a
Control E	-	0	5	5	20	37	72	88	92	98	100	9a

“Table 5, conclusion”

Material	Concentration (mg mL <sup>-1</sup> )	% Mortality/Day										S <sub>50</sub>
		1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
A	57	2	10	10	37	62	65	77	82	92	100	8a
A	14	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
Control E	-	23	38	53	83	87	87	97	98	98	100	3c
B	53	0	5	8	18	35	53	70	80	85	100	10a
B	106	0	5	5	27	53	63	78	82	92	100	10a
C	25	2	2	2	28	65	83	95	97	100	-	8b
C	50	0	2	8	25	42	60	83	88	90	100	10a
Control E	-	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
D*	12	0	2	3	18	30	63	85	93	98	100	9a
D*	24											

S<sub>50</sub>= Survival median 50%. Different letters after the S<sub>50</sub> values indicate a significant difference according to the log-rank test (b=0.01>p<0.05; c=p<0.01). Concentrations: A= 57 mg mL<sup>-1</sup>; B=53 mg mL<sup>-1</sup>; C=25 mg mL<sup>-1</sup>; D\*= 12 mg mL<sup>-1</sup>; ( )\*= concentration reduced to 50%.

Source: Morini et al. (2005).



The results shown in Table 6 indicate that five of the 11 possible combinations of the SD-E sub-fractions were toxic to leaf-cutting ants (A + B + C + D; A + B + C; A + C + D; A + C; B + C), and all of the toxic combinations contained sub-fraction C, which was composed of diglycerides and furfuranic lignans (sesamin and sesamol). The observed effects are likely due to the presence of lignin furfuranic, which is used as a synergistic factor in insecticides. However, sesamol exhibited a biological activity that was five times stronger than that of sesamin. Moreover, sub-fraction D, which was composed only of sesamin, either had an inhibitory effect on the action of other sub-fractions (B + C + D; C + D) or was unable to modify their actions (A + D; B + D), showing that the factor responsible for the synergistic toxic effect of sesame seeds is either sesamol or the combination of sesamin + sesamol, rather than sesamin alone (Table 6) (MORINI et al., 2005).

The efficiency of different commercial chlorpyrifos- sulfluramid- and fipronil-based formicidal baits as well as others that are manually manufactured using the leaves (15%) and seeds (10%, 20% and 30%) of *S. indicum* against *A. sexdens* Forel. control were assessed in the field. The nest activity was monitored at 30, 60, 90, and 150 days after treatment. The most efficient baits were sulfluramid- and fipronil-based, followed by the formulation derived from sesame leaves (15%). The sulfluramid- and fipronil-based baits caused colony activity to cease at 30 days, while the sesame leaf-based baits (15%) resulted in an 80% inhibition of activity at 90 days, confirming that *S. indicum* has great potential for the development of new products to control leaf-cutting ants (PERES-FILHO; DORVAL, 2003).

Table 6 Toxicity of SD-E sub-fraction combinations in *Atta sexdens* workers

Sub-fraction combination	% Mortality/Day										S <sub>50</sub>
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Control	0	0	2	10	35	53	72	90	93	100	10a
A+B+C+D*	2	7	18	47	73	90	93	95	97	100	7c
(A+B+C+D*)*	3	10	17	45	67	75	87	90	97	100	7c
Control	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
A+B+C	8	53	63	77	85	88	88	92	97	100	2c
(A+B+C)*	5	5	15	37	62	78	85	97	97	100	7b
Control	0	5	5	27	53	63	78	82	92	100	8a
A+B+D*	2	3	5	27	58	68	88	95	97	100	8a
Control	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
A+C+D*	27	47	57	67	70	75	88	93	100	-	3c
Control	0	5	5	27	53	63	78	82	92	100	8a
B+C+D*	0	5	5	20	37	72	88	92	98	100	9a
A+B	2	10	10	37	62	65	77	82	92	100	8a
Control	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
A+C	23	38	53	83	87	87	97	98	98	100	3c
A+D*	0	5	8	18	35	53	70	80	85	100	10a
Control	0	5	5	27	53	63	78	82	92	100	10a
B+C	2	2	2	28	65	83	95	97	100	-	8b
B+D*	0	2	8	25	42	60	83	88	90	100	10a
Control	0	5	7	23	32	57	75	78	85	100	9a
C+D*	0	2	3	18	30	63	85	93	98	100	9a

S<sub>50</sub>= Survival median 50%. Different letters after the S<sub>50</sub> values indicate a significant difference according to the log-rank test (b=0.01>p<0.05; c=p<0.01). Concentrations: A= 57 mg mL<sup>-1</sup>; B=53 mg mL<sup>-1</sup>; C=25 mg mL<sup>-1</sup>; D\*= 12 mg mL<sup>-1</sup>; (\*)= concentration

---

reduced to 50%

Source: Morini et al.(2005)

### 3.3.2 *Viola sebifera*

Phytochemical analysis of the leaves of *Viola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) resulted in the isolation of three lignans, (+)-sesamin (1), (-)-hinoquinin (2), and (-) – kusunokinin (3) (Figure 4), and three flavonoids, quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside, quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside, and quercetin-3-methoxy-7-O- $\beta$ -D-glucoside. Techniques such as high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography were employed in this process. The isolated substances were added to the artificial diet and tested against *A. sexdens* leaf-cutting ants at a concentration of 200 or 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Diets (0.4-0.5 g per dish) treated with the compounds (experimental treatment) or without (control) were offered daily in a small plastic cap. The percentage of survival was plotted as a function of time in a survival curve that was then used to calculate the median survival time (S50, the time at which 50% of the ants in each experiment remained alive). The lignin (-) - kusunokinin (3) resulted in 90% mortality of *A. sexdens* workers after 25 days of monitoring compared to the controls fed with an untreated diet. Although the other substances did not show biological activity against the ants, the (+)-sesamin (1), (-)-hinoquinin (2) and (-)-kusunokinin (3) lignans inhibited the growth of the symbiotic fungus by 74%, 72%, and 100%, respectively (Figure 4) (BICALHO et al., 2012).

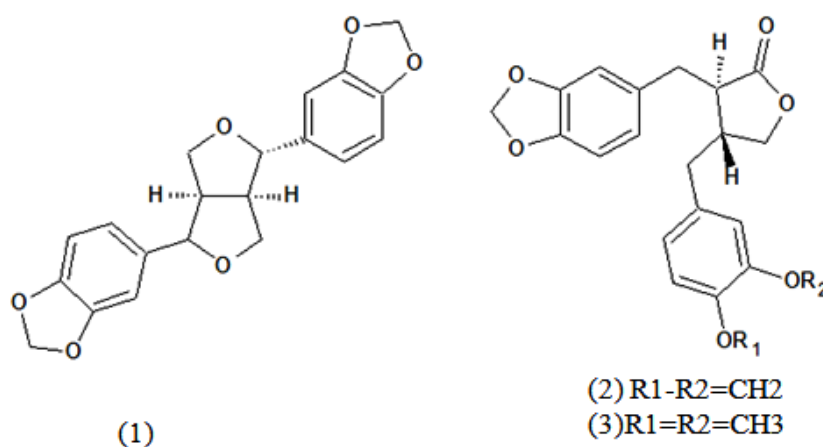


Figure 4 Chemical structures of the compounds isolated from *Virola sebifera*, (+)-sesamin (1), (-)-hinoquinin (2), and (-) – kusunokinin (3)

Source: Bicalho et al. (2012).

### 3.3.3 *Canavalia ensiformes*

*In vitro* tests showed inhibitory effect on the symbiotic fungus of a hexanic extract of *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) leaves, applied at a 1,000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration. This extract was fractionated by column chromatography using silica gel as the stationary phase. A total of 11 fractions were obtained and used in fungal bioassays at a concentration of 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Only one fraction (fraction 9) was active; all fractions were esterified with diazomethane and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to identify the active components. The main compounds identified in the active fraction were long-chain saturated fatty acids. In these experiments, it was not possible to identify which of the fatty acids was responsible for the fungicidal action. However, comparison of the different fractions showed that the fatty acids with chains containing 11, 17, 19, 22, and 23 carbon atoms were likely the most active (Table 7), as the fractions in which these fatty acids were

not among the major components showed no fungicidal activity (MONTEIRO et al., 1998).

Table 7 Fatty acids found in *C. ensiformis*

Fraction	Major compounds	Minor compounds
9*	C <sub>11</sub> , C <sub>16</sub> , C <sub>17</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>19</sub> , C <sub>20</sub> , C <sub>22</sub> , C <sub>23</sub> , C <sub>24</sub> , C <sub>26</sub>	C <sub>8</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>15</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>25</sub> , C <sub>27</sub> , C <sub>28</sub> , C <sub>30</sub>
2	C <sub>10</sub> , C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>24</sub> , C <sub>26</sub>	C <sub>14</sub> , C <sub>15</sub> , C <sub>17</sub> , C <sub>22</sub> , C <sub>23</sub> , C <sub>25</sub> , C <sub>28</sub> , C <sub>29</sub>
3	C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub>	C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>15</sub>
4	C <sub>16</sub> , C <sub>20</sub>	C <sub>18</sub> , C <sub>21</sub> , C <sub>22</sub>
5	C <sub>16</sub>	C <sub>12</sub>

\*Active fraction

Source: Monteiro et al.(1998).

### 3.3.4 *Raulinoa echinata*

Phytochemical analyses of the roots of *Raulinoa echinata* R.S.Cowan (Rutaceae) resulted in the isolation and identification of the following limonoids: fraxinellone, fraxinellone, and epoxy-fraxinellone. Limonexic acid was isolated from the stem of the plant. The toxicity of the compounds against *A. sexdens* was determined in ingestion bioassays according to the protocol described by Bueno et al. (1997). The ants in the treatment groups received a diet enriched with epoxy-fraxinellone or limonexic acid at a concentration of 200 µg mL<sup>-1</sup>. Control ants were fed with a component-free diet. Over 25 days, the number of dead ants in each Petri dish was counted, the survival curve of the leaf-cutting ants in each treatment was estimated, and their average longevity was calculated. Limonexic acid (4) (Figure 5) reduced the longevity of *A.*

*sexdens* considerably (11 days) compared to the control (22 days) (BIAVATTI et al., 2002). *R. echinata* was also able to produce substances that were active against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ants; several furoquinoline alkaloids (skimmianine (5), kokusaginine (6), maculine (7) and flindersiamine (8)) and quinolones (2-n-Nonyl-4-quinolone (9), 1-Methyl-2-n-nonyl-4-quinolone (10), 1-Methyl-2-phenyl-4-quinolone (11)) (Figure 6; Table 8) that exhibited fungicidal activity against *L. gongylophorus* were isolated from extracts of its stems and leaves (BIAVATTI et al., 2002).

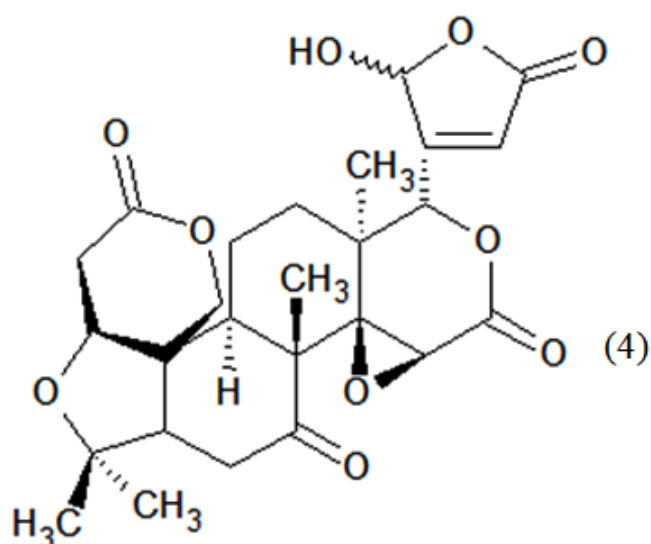
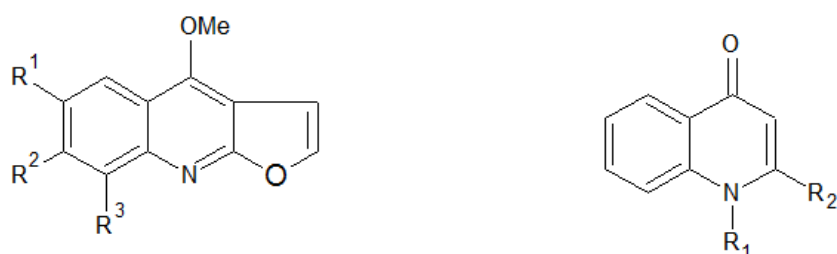


Figure 5 Limonexic acid isolated from *Raulinoa echinata* stems  
Source: Biavatti et al.(2005).



(5) R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=R<sup>3</sup>=OMe

(6) R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=OMe, R<sup>3</sup>=H

(7) R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=OCH<sub>2</sub>O, R<sup>3</sup>=H

(8) R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=OCH<sub>2</sub>O, R<sup>3</sup>=OMe

(9) R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=*n*-nonyl

(10) R<sup>1</sup>=Me, R<sup>2</sup>=*n*-nonyl

(11) R<sup>1</sup>=Me, R<sup>2</sup>=phenyl

Figure 6 Compounds identified as skimmianine (5), kokusagine (6), masculine (7), flindersiamine (8), 2-*n*-Nonyl-4-quinolone (9), 1-Methyl-2-*n*-nonyl-4-quinolone (10), and 1-Methyl-2-phenyl-4-quinolone (11) based on comparison with spectral data presented in the literature

Source: Biavatti et al.(2002).

Table 8 Evaluation of the growth inhibitory activity of crude extracts, fractions, and compounds of *R. Echinata*

Extract/fraction/compound	% growth inhibition of <i>L. gongylophorus</i>					
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	50	100	250	500	1000
MSE <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	80
Skimmianine (1)	60	80	NT	NT	NT	NT
Kokusagine (2)	20	100	NT	NT	NT	NT
Maculine (3)	10	50	NT	NT	NT	NT
Flindersiamine (4)	-	50	NT	NT	NT	NT
MLE <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	80
MLE (hexane fraction)					80	100
2-n-Nonyl-4-quinolone (5)	20	50	NT	NT	NT	NT
1-Methyl-2-n-nonyl-4-quinolone (6)	-	-	-	-	-	-
1-methyl-2-phenyl-4-quinolone (7)		NT	NT	NT	NT	NT

<sup>a</sup>MSE: Methanol stem extract, <sup>b</sup>NT: not tested, <sup>c</sup>MLE: methanol leaf extract

### 3.3.5 *Helietta puberula*

Methanolic, hexanic, and dichloromethane extracts obtained from the stems, leaves, and branches of *Helietta puberula* R. E. Fr. (Rutaceae) were tested against *A. sexdens* workers and the symbiotic fungus of this ant species. Experimental diets were prepared by mixing plant material (crude extract, partially purified extract, or pure compound) and the basic formula described by Bueno et al. (1997). The final concentrations of crude extracts, fractions, and isolated substances from *H. puberula* in the diet were 2.0, 1.6, and 0.3 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. Blocks of 0.4 g of the experimental diets per plate (control or



experimental) were offered daily to the workers. Evaluations were conducted over 25 days, and the number of dead ants was recorded daily. The following substances were isolated from *H. puberula*: anthranilic acid (12), flindersiamine (13), dictamnine (14), kokusaginine (15), maculine (16), and sitosterol. The anthranilic acid, kokusaginine, and dictamnine resulted in 90%, 86%, and 88% mortality, respectively, compared with 68% mortality in the control. The substances anthranilic acid, kokusaginine, masculine, and dictamnine caused fungal inhibition ( $\geq 80\%$ ) at a concentration of  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figure 7) (ALMEIDA et al., 2007).

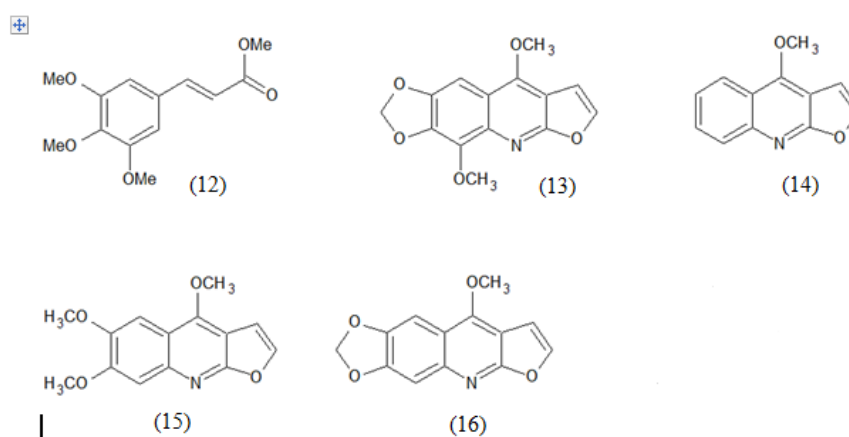


Figure 7 Molecular structures of substances from *H. puberula*: anthranilic acid (12), flindersiamine (13), dictamnine (14), kokusaginine (15), and masculine (16)

Source: Almeida et al.(2007).

### 3.3.6 *Eucalyptus* sp.

Leaf-cutting ants may exhibit behavioural changes when exposed to plant extracts; Anjos and Santana (1994) observed bites and mutilations among

*A. sexdens* and *A. laevigata* nestmates subjected to contact with leaves of four *Eucalyptus* sp. belonging to the family Myrtaceae. With the aim of isolating and identifying the compounds responsible for these changes, *E. maculate* leaves were subjected to extraction with hexane, followed by chromatographic fractionation, resulting in the isolation of six active sesquiterpenes (elemol,  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -eudesmol, guaiol, hinesol, and  $\gamma$ -eudesmol).

Fragments of filter paper in a rectangle, square, or triangle shape were prepared and (a) impregnated with solvent alone as a control (square), (b) left blank (rectangle), or (c) impregnated with the treatment to be tested using 100  $\mu$ L of the extract solution or pure compound (triangle).

After solvent evaporation, two of the filter paper fragments of each of the three different geometric shapes were placed on three glass slides, which were then transferred to the colonies. Monitoring was performed for 30 minutes after placement of the filter paper, and the number of groups of attackers, the number of ants in each group, and the number of mutilated ants in each group were counted. Elemol (17) and  $\beta$ -eudesmol (18) (Figure 8) were the most active ingredients, and the latter substance was associated with greater numbers of groups of attackers (84.2) and mutilated ants (285.8). After contact with the filter paper impregnated with  $\beta$ -eudesmol, the ants exhibited alarm behaviour and held their mandibles open. When encountering nestmates that had previously contacted the filter paper, they touched their antennae and then attacked each other, frequently on the legs, but also on other parts of the body (MARSARO JUNIOR et al., 2004).

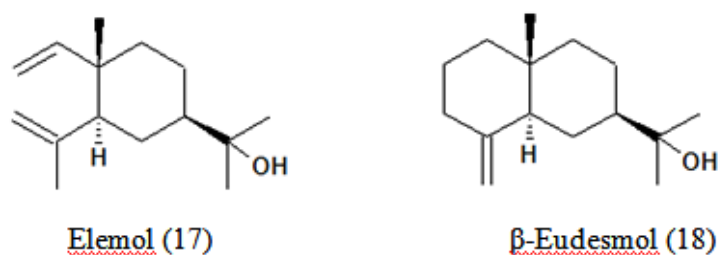


Figure 8 Chemical structures of the sesquiterpenes identified in the most active fraction of the *E. maculate* leaf extract

Source: Marsaro Junior et al. (2004).

Upon analysis, the composition of the chemical profile of the cuticles of the workers that had contact with  $\beta$ -eudesmol was different than that found in the other workers. (E)- $\beta$ -farnesene, busenol, and (E,E)-farnesol were present in the cuticles of ants exposed to  $\beta$ -eudesmol (MARINHO et al., 2008). The changes in the composition of the cuticle interfered in the process of recognition between nestmates. The ants triggered alarm behaviour when they did not recognise the workers exposed to  $\beta$ -eudesmol.

### 3.3.7 *Cedrela fissilis*

The survival of *A. sexdens* workers was significantly reduced when they were fed diets containing hexane or dichloromethane-soluble extracts of the root and leaves of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). These extracts and those derived from fruits and branches, which were hexane- or dichloromethane-soluble, respectively, also inhibited the growth of the *L. gongylophorus* fungus (BUENO et al., 2005; LEITE et al., 2005).

The limonoid  $3\beta$ -acetoxicarapin and the triterpenes oleanoic and oleanonic acid were isolated from roots of *C. fissilis*. These compounds and six other mexicanolide-type limonoids (cipadesin A, ruageanin A, cipadesin, khayasin T, febrifugin, and mexicanolide) that were previously isolated from *Cipadessa fruticosa* Blume exhibited insecticidal activity against *A. sexdens* leaf-cutting ants. The median survival period (S50) was significantly different from that of the control, confirming activity against *A. sexdens* (Table 9) (LEITE et al., 2005).

Table 9 Mortality (%) of *Atta sexdens* workers fed on compounds 1-11 at a concentration of 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Compounds	Days										S <sub>50</sub>
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
1- cipadesin B	0	0	6	22	40	58	76	88	92	98	9 <sup>a</sup>
2- swietemahonolide	0	0	4	40	54	58	82	90	96	98	8 <sup>a</sup>
3- 3 $\beta$ -acetoxycarapin	0	2	12	34	50	76	98	100	-	-	8 <sup>a</sup>
4- oleanolic acid	0	0	10	52	70	90	100	-	-	-	6 <sup>a</sup>
5c- oleanonic acid	0	0	8	38	60	86	100	-	-	-	8 <sup>a</sup>
6- cipadesin A	0	2	8	34	46	72	100	-	-	-	9 <sup>a</sup>
7- ruageanin A	0	4	18	50	62	74	96	98	98	100	6 <sup>a</sup>
8- cipadesin	0	8	12	46	68	76	100	-	-	-	7 <sup>a</sup>
9- khayasin T	0	4	10	54	72	86	98	100	-	-	6 <sup>a</sup>
10- febrifugin	0	2	6	38	58	70	88	94	98	100	7 <sup>a</sup>
11- mexicanolide	0	4	16	50	60	70	100	-	-	-	6 <sup>a</sup>
Control (ethyl acetate)	0	0	6	22	36	50	74	90	94	96	10

<sup>a</sup>Significant difference according to the log-rank test (p<0.05).

Source: Leite et al.(2005).

### 3.3.8 *Azadiracta indica*

Seeds of *Azadiracta indica* were triturated and pressed, yielding a neem paste. After one week, the floating material was isolated, which was referred to as crude extract of neem oil. A known mass of the remaining material, referred

to as crude extract of seed neem paste, was macerated for three days three times at room temperature and extracted with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane and methanol), resulting in three crude extracts. When incorporated in an artificial diet, the crude extract of neem seed oil caused significant toxicity to *A. sexdens* workers at all of the concentrations tested. The survival of the ants was significantly reduced in the diets containing the neem seed paste hexane extract at concentrations of 10 and 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the dichloromethane extract at all concentrations tested (2, 10, and 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), and the methanol extract at concentrations of 10 and 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

There was a negative relationship between the neem oil concentration and the frequency of contact of ants with the artificial diet. The lowest frequency of contact was obtained with the highest concentration tested (30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Moreover, the initial contact with the diet was dependent on the presence of neem. Thus, the period required for the ants to feed on the artificial diet for the first time was 8 seconds in the control, 4 minutes and 36 seconds at a concentration of 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 19 minutes at a concentration of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and 55 minutes at a concentration of 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Some changes in the behaviours of the ants were observed when the workers contacted the diets containing neem seed oil. Contact between the antenna or legs and the diet caused instantaneous retraction of these body parts. The ants positioned themselves offensively with open mandibles and performed self-grooming. The workers that cleaned themselves by licking showed symptoms of intoxication, such as slow movements, disorientation, and prostration (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2006).

The hexanic extract of *A. indica* neem was tested against *Acromyrmex rugosus* F. Smith (Formicidae) workers. Two colonies of *A. rugosus* were used, and from each colony, 30 groups of 20 workers each were isolated. A citrus pulp containing neem at concentrations of 0.1, 1.0, and 10% was offered to these groups. In the treatments, pastes composed of hexanic extracts of neem (from

leaves, branches and seeds) were prepared with the following composition: pure glucose (10%), citrus pulp powder and soybean oil (10%). The sulfluramid treatment was offered in the form of a paste, in which 0.3% sulfluramid was dissolved in 10% soybean oil and mixed with citrus pulp powder and 10% pure glucose. The positive control was prepared in the same manner, but the active sulfluramid was not added to the paste. Treatments were performed with 5 g of paste per replicate, which was removed from the jars after 48 hours. Monitoring lasted five minutes and was performed immediately, 30 minutes, and 24 hours after treatment. The relative frequencies of each of the workers' behaviours and the number of deaths were recorded. High mortality was observed within the first 24 h in the treatments with neem (>20 workers) compared to the control (5 workers), which is not the slow type of action desired for formicides. The delayed action of the active ingredients in formicide formulations is an essential feature because colonies of leaf-cutting ants are very populous, and the control of their nests depends on contamination of all individuals. If ants detect that the presented substrate is not adequate, they will stop carrying it and can even remove parts of the symbiotic fungus contaminated with this substrate and isolate it in waste chambers (BRUGGER et al., 2008).

### **3.3.9 *Simarouba versicolor***

The dichloromethane-soluble fraction of methanolic extracts of the leaves, stems, and branches of *Simarouba versicolor* St. Hill (Simaroubaceae) was tested *in vitro* on ants through ingestion bioassays and with the symbiotic fungus in culture medium. The median survival period for workers was significantly reduced (S50=4 days) compared to the control (S50=16 days), and 100% inhibition of *L. gongylophorus* growth was observed. From these fractions, two alkaloids were isolated, 4,5-dimethoxy-canthin-6-one (19) and 5-

methoxy-canthin-6-one (20) (Figure 9), both of which were toxic to the symbiotic fungus and completely inhibited growth at a concentration of 0.1 mg mL<sup>-1</sup>. However, only the alkaloid 5-methoxy-canthin-6-one reduced the median survival period of the workers from 14 days (control) to seven days at a 0.3 mg mL<sup>-1</sup> concentration (Table 10). The triterpenes isolated from the other extracts of the plant (lupenone and lupeol) showed no deleterious effects on the leaf-cutting ants of the symbiotic fungus (PENAFLORES et al., 2009).

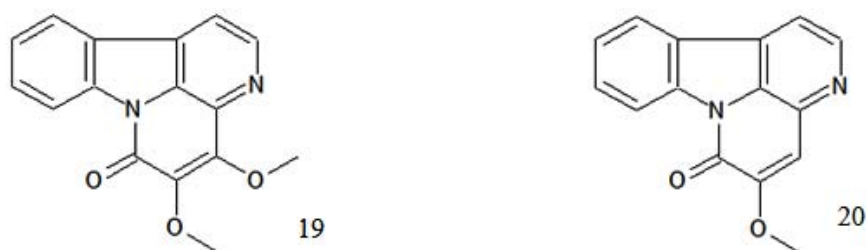


Figure 9 Chemical structures of substances isolated from *Simarouba vesicolor*: 4,5-dimethoxycanthin-6-one (19) and 5-methoxycanthin-6-one (20)

Source: Peñaflores et al. (2009).



Table 10 Toxicity (% mortality and  $S_{50}$ ) of substances isolated from *Simarouba versicolor* in *Atta sexdens* workers

Treatment <sup>1</sup>	Day of experiment										$S_{50}$ <sup>2</sup>
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Control	0	2	8	22	30	38	52	62	74	76	14a
Lupenone	4	4	6	12	24	30	46	54	64	76	16a
4,5-dimethoxycanthin-6-one	2	2	8	34	36	48	56	58	68	82	13a
Lupenol	2	2	10	26	26	28	34	36	44	54	19a
5-methoxycanthin-6-one	0	0	10	46	52	56	76	78	80	88	7b

<sup>1</sup>Isolated substances at a concentration of 0.3 mg mL<sup>-1</sup>;

<sup>2</sup> $S_{50}$ =Survival median 50%. Different letters after the  $S_{50}$  values indicate a significant difference according to the log-rank test. Different letters after the  $S_{50}$  values compared to the respective control indicate a significant difference according to the log-rank test ( $P < 0.05$ ).

Source: Peñaflores et al.(2009).

### 3.3.10 *Ageratum conyzoides*

An assessment of the formicidal activity of a hexanic extract from the leaves of goatweed, *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), against leaf-cutting ants was performed using the acetone-diluted extract at a concentration of 1.0 mg mL<sup>-1</sup>. Each worker was topically treated with 1.0  $\mu$ L of this solution, which was applied on the pronotum of the insect. In the control treatment, the insects were treated with an equal volume of pure acetone. The numbers of living and dead individuals were counted 24 and 48 hours after treatment. The crude extract of goatweed caused increased mortality of *Atta laevigata* F. Smith (Hymenoptera: Formicidae) and *Atta subterranea subterranea* Forel

(Hymenoptera: Formicidae) workers. The goatweed extract was then fractionated, resulting in the isolation of the compound coumarin. Coumarin was tested against ants at different concentrations (0.5, 4.0, 7.0, 16.0, 50.0, and 100.0 mg mL<sup>-1</sup> in acetone) to determine its toxicity among the two species of leaf-cutting ants. The median lethal concentration (LC50) decreased (10.9-fold) with increased application time for *A. subterraneus subterraneus*. The LC50 was 55.42 mg mL<sup>-1</sup> at 24 hours and decreased to 5.07 mg mL<sup>-1</sup> at 48 hours. For *A. laevigata*, the LC50 decreased 1.8-fold, from 23.20 mg mL<sup>-1</sup> at 24 hours to 12.70 mg mL<sup>-1</sup> at 48 hours. Thus, coumarin is a potential agent for ant control in the form of granulated attractive baits because it has a delayed insecticidal effect (ARAÚJO et al., 2008).

### 3.3.11 *Ricinus communis*

Dry *R. communis* leaves (2 kg) were ground in a Willey mill, and crude extracts were prepared via sequential maceration (3 litres for 7 days for each solvent) with hexane (24.8 g of extract), dichloromethane (32.8 g), ethyl acetate (18.8 g), methanol (54.0 g), and water. With the exception of the water extract, all extracts were subjected to chromatography on silica gel 60 as the stationary phase under vacuum (0.040-0.063 mm, 400 g; column with a sinterised filter in the bottom, internal diameter 10 cm, length 25 cm) with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol (1 litre each) as eluents, yielding four fractions for each extract. The water extract was not fractionated. A portion of the methanol fraction of the hexane extract was refractionated, yielding 12 fractions (MFHE 1-12). These extracts were tested against the symbiotic fungus according to the methodology of Pagnocca et al. (1990) [49]. The sub-fractions MFHE-6, MFHE-9, and MFHE-10 inhibited fungal growth by 80% at a concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup>. The same result was observed for the MFHE-11

sub-fraction at a 1.0 mg mL<sup>-1</sup> concentration. Sub-fraction MFHE-9 contained a mixture of two glycosidic steroids ( $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside and stigmasterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside) and fatty acids (decanoic, myristic, pentadecanoic, palmitic, heptadecanoic, stearic, eicosanoic, docosanoic, tricosanoic, and tetracosanoic acids). Among the above-mentioned compounds, only palmitic acid exhibited antifungal activity and inhibited the growth of the symbiotic fungus by 80% (Table 11).

Table 11 Activity of fatty acids present in the methanol fraction of hexane extracts from *Ricinus communis* leaves (MFHE) against *Leucoagaricus gongylophorus*

Acid	%
Decanoic	1.2
Myristic	0.5
Pentadecanoic	6.4
Palmitic	81.0
Heptadecanoic	0.3
Stearic	6.6
Eicosanoic	1.1
Docosanoic	0.2
Tricosanoic	0.7
Tetracosanoic	0.2

Source: Bigi et al.(2004).

The methanolic fraction of the dichloromethane-soluble extract of *R. communis* leaves was also re-fractionated, resulting in the isolation of ricin (21) (Figure 10) and monoglyceride (1-palmitic acid glycerol ester). Ricin caused significant death of *A. sexdens* workers when added to their artificial diets. The

median survival periods ( $S_{50}$ ) were 6.93 and 5.27 days at 0.2 and 0.4 mg mL<sup>-1</sup>, respectively, compared to 10.82 days in the control. However, the effect on mortality was dose dependent. Symptoms of intoxication could be perceived after 24 hours and consisted of a reduction or cessation of movement, followed by disorientation, lack of coordination, and death (BIGI et al., 2004).

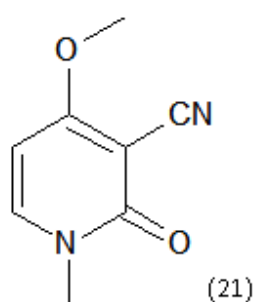


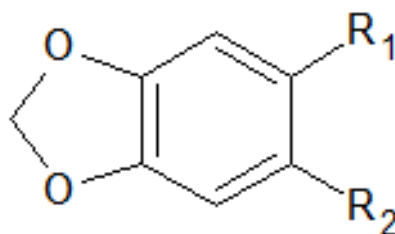
Figure 10 Ricinin (21) isolated from leaf extracts of *Ricinus communis*

Source: Bigi et al.(2004).

### 3.3.12 Synthetic analogues of plant origin

The development of the symbiotic fungus *L. gongylophorus* is inhibited *in vitro* by synthetic compounds containing a piperonyl group: 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) methane (22); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) ethane (23); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) butane (24); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) hexane (25); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) octane (26); 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) decane (27); and 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) dodecane (28) (Figure 11). Moreover, *A. sexdens* workers fed daily with an artificial diet containing these compounds showed high mortality compared to controls. The inhibition of fungal growth increased

with the number of carbon atoms in the lateral chain, which varied from 1 to 8 (substances 22 to 26). Compounds containing 10 or 12 carbon atoms in the lateral chain did not inhibit fungal growth (substances 27 and 28) (Figure 11). Compound 26, 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) octane, was the most active and inhibited fungal development by 80% at  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ . In workers, a toxic effect was caused by compound 26 (C8); this effect increased with an increase in the number of carbon atoms in the lateral chains (C10 and C12). Thus, at the same concentration ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), the mortality rates after eight days of ingestion were 82%, 66%, and 42% under treatment with 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) decane (compound 28), 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) dodecane (compound 27), and compound 26, respectively, while for piperonyl butoxide, the observed mortality was 68%. The last compound, which is known as a synergistic insecticide, inhibited the symbiotic fungus with an intensity that was statistically similar to that observed for synthetic compound 26. The results indicate that a formulation can be designed to attack both ants and their symbiotic fungus; such a formulation could represent an advantage over the chemical products used for leafcutting ant control, which are directed only towards the ants (VICTOR et al., 2001).



- 22-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 23-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 24-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 25-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 26-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 27-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 28-  $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$   
 29-  $R_1 = \text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

Figure 11 Structures of the synthesised compounds  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) methane (22);  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) ethane (23);  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) butane (24);  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) hexane (25);  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) octane (26);  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) decane (27);  
 1-(3,4-methylenedioxybenzyloxy) dodecane (28); and the  
 commercial compound piperonyl butoxide (29)

Source: Victor et al. (2001).

Several studies have suggested that the amides found in species of the *Piper* genus show potential for insecticidal use due to their effectiveness and knockdown effects. Therefore, the natural amides N-pyrrolidine-3-(4,5-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide and Npiperidine-3-(4,5-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide, found in the roots of *Piper piresii*

Yunck (Family: Piperaceae), were used as a model for the synthesis of analogous amides.

The 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-(E)-propenamide (30) portion was maintained, and only groups R1 and R2 linked to the nitrogen (Figure 12) were altered. Thus, nine amides were synthesised, and the yield varied between 36 and 86% (Table 12; Figure 13). Compounds 3 ( $S_{50}$ = 11 days) and 8 ( $S_{50}$ =7.5 days) significantly reduced the median survival period ( $S_{50}$ ) for workers compared to the control ( $S_{50}$ = 14 days) at 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  when added to the artificial diet offered daily. Compounds 1, 2, 4, 5, 6, 7, and 9 had no effect on the median survival period at any of the concentrations tested (25, 50, and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). At 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , compounds 1, 2, and 3 completely inhibited fungal growth, and partial inhibition was observed for compounds 4 (80%), 5 (40%), and 6 (20%), while compounds 7, 8, and 9 had no effect on the growth of the symbiotic fungus (PAGNOCCA et al., 2006).

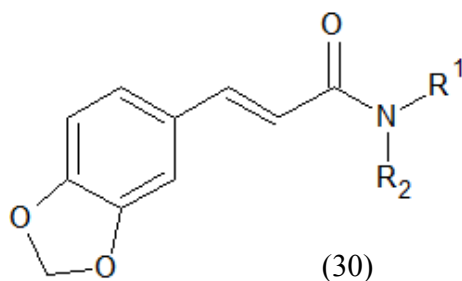

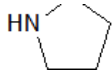
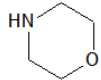


Figure 12 2-(E)-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propenamide group

Source: Pagnocca et al.(2006).

Table 12 Amines, the respective yields of the amides, and the eluents used in the chromatographic separation

Amide	Amine	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	Yield (%)
1	Piperidine		44
2	Diethylamine	N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	42
3	Pyrrolidine		68
4	2-Methylbutylamine	NHCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	38
5	Morpholine		40
6	Aniline	NHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	39
7	Diisopropylamine	N[CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	36
8	Benzylamine	NHCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	36
9	Dicyclohexylamine	N(C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ) <sub>2</sub>	86

Source: Pagnocca et al.(2006).

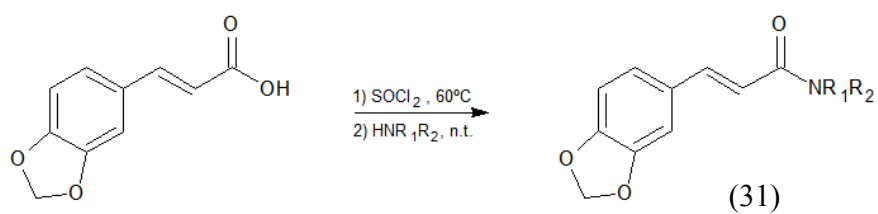


Figure 13 Synthesis of amides 1-9

Source: Pagnocca et al.(2006).



### ***3.4 Control of leaf-cutting ants via enzymatic inhibition***

When the cut plant fragments reach the colony, a complex process of preparation of the plant substrate for its incorporation into the fungal garden begins. During this processing, the workers may ingest the plant's sap while cutting and pressing the borders of the plant fragment. By scraping the surface, they remove the epicuticular wax layer and facilitate the decomposition of the substrate by the fungus (ANDRADE et al., 2002; DINIZ, 2000) indicating the importance of the hydrolytic enzymes in this process. This behaviour is also related to the decontamination of the substrate (QUILAN; CHERRETT, 1977).

Ultra-structural studies of the colonisation of the plant substrate by the fungus have demonstrated that the fungus can only use the portions that have had their border cut. In addition, the cuticular surface of the leaf at the time of colonisation appears to be intact, which suggests an absence of cutinases (enzymes that catalyse the hydrolysis of cutin, a structural component of the cuticle of the plant) in this process. Therefore, it is believed that this symbiotic fungus is a saprophyte that is unable to penetrate into plants that are not damaged (Figure 14) (ERTHAL JUNIOR; SILVA, 2009).

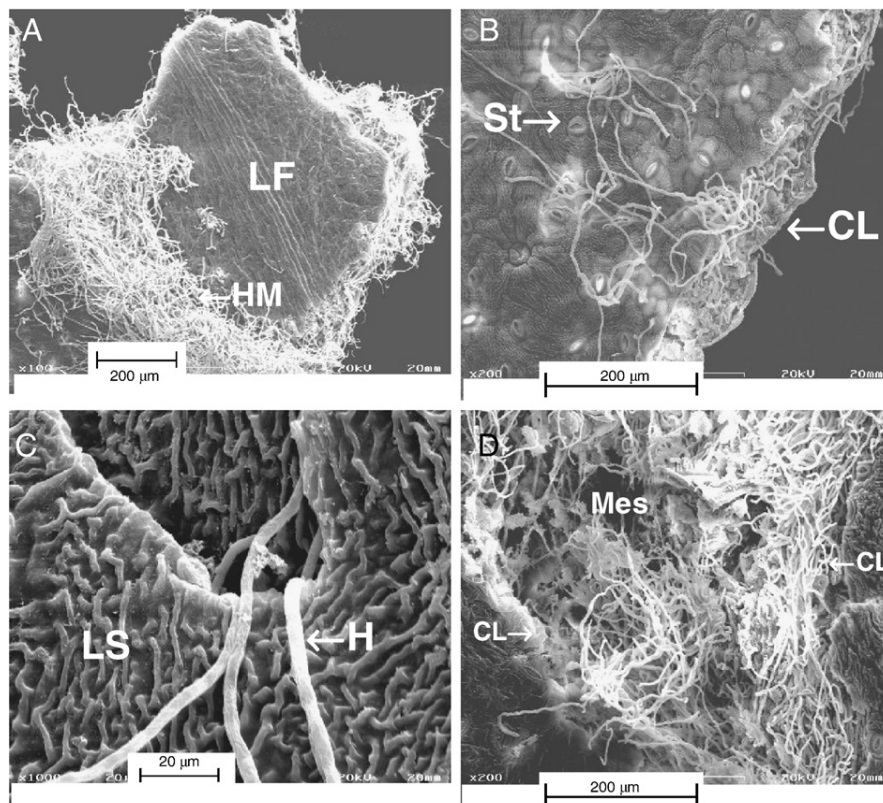


Figure 14 Colonisation of freshly cut leaves by *Leucoagaricus gongylophorus*. Panel A: LF—leaf fragment; HM—hyphal mass. Magnification:  $\times 100$ . Panel B: St—stomata; CL—cut leaf edge exposing mesophyll tissue. Magnification:  $\times 200$ . Panel C: H—hyphae; LS—leaf surface. Magnification:  $\times 1000$ . Panel D: CL—cut leaf edge; MS—exposed mesophyll tissue. Magnification:  $\times 200$

Source: Erthal Junior e Silva (2009).

Therefore, maceration aids in the destruction of the physical barrier of the leaf cuticle, increasing permeability to allow fungal growth, which is assisted by enzymes present in the faecal fluid (MARTIN et al., 1975). The symbiotic fungus is an important mediator involved in providing nutrition to the ants via the hydrolysis of polysaccharides from plant (SIQUEIRA et al., 1998) as it

produces large amount of enzymes, particularly pectinases that are ingested by ants, concentrated in the intestine, returned to the fungal garden via faecal fluid, and utilised for the digestion of plant tissues (RONHEDE; ROSENDAHL, 2004). Therefore, this association is also essential for fungal access to the nutrients in the plant material that is transported by the ants to the nest (SIQUEIRA et al., 1998).

The profile of the hydrolytic enzymes involved in this relationship between leaf-cutting ants and fungi has been studied. The extracts from the fungal hyphae of garden fungi exhibit a wide range of activities involving carbohydratases (pectinase, laminarinase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase), with the proteinase chitinase presenting the highest activity (ERTHAL JUNIOR; SILVA, 2009).

Extracts from fungal gardens contain a wide variety of digestive enzymes, including carbohydratases (e.g., pectinase, laminarinase, and  $\beta$ -1,3 glucanase) and proteinases (trypsinase and chymotrypsinase) (ERTHAL JUNIOR; SILVA, 2009). Interestingly, although the fungus (hyphal extracts) produces chitinase, the plants do not contain chitin. It has been suggested that the chitinases present in the rectal fluid of primitive genera (*Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, and *Myrmicocrysta*) are important in the degradation of substrates such as the carcasses of leaf-cutting ants, which can be used as a substrate for the growth of new hyphae from the symbiotic fungus. It has also been proposed that these enzymes may play an important role in the lysis of competitive funguses, many of which have cellular walls made of chitin (MARTIN et al., 1973).

The results from analysis of the labial glands of larvae and adults of *A. subterraneus* indicate that they secrete chitinases. Chromatographic tests to detect chitinolytic activity in the labial glands of the larvae revealed profiles similar to those observed for the glands of the workers, indicating that this

enzymatic activity may have a fungal origin. Interestingly, the peak of chitinolytic activity in the middle intestine of the larvae does not coincide with the peak in the labial gland, indicating that the chitinase produced in the labial gland is not active in the middle intestine (ERTHAL JUNIOR; SILVA; SAMUELS, 2007; MARTIN et al., 1973).

In addition to chitinases, pectinases, xylanases, and cellulases derived from the fungus have been detected in the faecal fluid of *Atta colobica tonsipes* (BOYD; MARTIN, 1975). Pectinases present in the faeces of *Acromyrmex echinator* and *Atta colombica* have been suggested to be of fungal origin (RONHEDE; ROSENDAHL, 2004). Interestingly, no pectinase, xylanase, or cellulase activity was detected in *A. subterraneus* adults. However, elevated  $\alpha$ -glycosidase activity was detected in fractions from the middle intestine and rectum of adult leaf-cutting ants, indicating the importance of this enzyme in the assimilation of glucose and, most likely, of saccharose and maltose present in the plant material (ERTHAL JUNIOR; SILVA; SAMUELS, 2004). Pectinases and xylanases were detected in the middle intestine of the larvae, where their only source of nutrients is the symbiotic fungus (ERTHAL JUNIOR; SILVA; SAMUELS, 2004).

Febvay and Kermarrec (1984) suggested that digestion of the walls of the fungal cells occurs in the infrabuccal pocket of *Acromyrmex octospinosus*. It is possible that the adult garden ants regurgitate chitinases through their labial glands onto the fungal material to feed the larvae, initiating the partial digestion of fungal parts, without the adult benefiting from ingestion. The larvae can regurgitate their own secretions from their labial glands, providing the energetic needs of the adults, who receive these liquids through trophallaxis.

Other authors have reported that the secretions offered by the larvae originate in a liquid produced from the anal region, in a process referred to as proctodeal trophallaxis (Figure 15). The workers contact the anal region of the larvae, which may be of different sizes, and the larvae release a small transparent drop that is immediately ingested by the workers. This observation reveals that the larvae of the leaf-cutting ants play a fundamental role in the nutrient flux in the colony because, although adult individuals are incapable of feeding on the solid portions of the fungus, the larvae are able to feed on these portions, digest their walls, and transfer nutrients to the haemolymph, where they are absorbed by the Malpighian tubules, transferred to the posterior intestine, and offered to the workers, making them available to other individuals in the colony (BUENO et al., 2008).

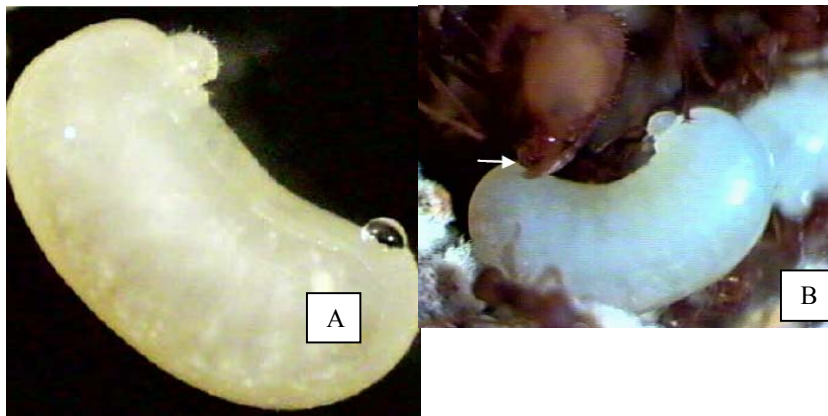


Figure 15 Larvae of *A. sexdens* expelling a droplet of proctodeal liquid (A). After touching the antenna, an *A. sexdens* worker immediately proceeds to ingest the proctodeal liquid by licking the larva's anus with its glossa (arrow) (B)

Source: Shneider (2003).

Hydrolytic enzymes are directly involved in this energy transfer within the colony. Thus, studies that seek new insecticides have been conducted with an emphasis on plant extracts or pure substances that exhibit fungicidal, insecticidal, or enzyme inhibitory actions. The integrated application of these three types of functions should lead to the development of a new product with an effective control capacity. In this context, crude extracts of *Cedrela fissilis*, *Tapirira guianensis*, and *Simarouba versicolor* were evaluated and found to inhibit the activity of the pectinase enzyme present in the faecal liquid of *A. sexdens rubropilosa* (LEITE, 2005; ZAVAN, 2005). These enzymes appear to be essential for the nutrition of the ants and the fungus in plant materials (SIQUEIRA et al., 1998).

Plant extracts that inhibit enzymatic activity may be useful for the control of leaf-cutting ants and constitute a new approach with respect to methods for controlling these insects. This type of control should be evaluated further to determine the viability and effectiveness of its use in the field and confirms suggested potential. Phytochemical analyses of active extracts are being conducted with the purpose of isolating the substances associated with enzymatic inhibition.

#### 4 CONCLUSIONS

Data from the literature clearly demonstrate that several plants are capable of producing substances with direct action against leaf-cutting ants and/or their symbiotic fungi, such as ricinine (*Ricinus communis*; Euphorbiaceae);  $\beta$ -eudesmol (*Eucalyptus maculata*; Myrtaceae), the limonoid limonóxico acid (*Raulinoa echinata*; Rutaceae), sesamin and sesamoline (*Sesamum indicum*; Pedaliaceae), anthranilic acid, kokusaginine and dictamine (*Helietta puberula*; Rutaceae), 4,5- dimetoxicantin-6-one and 5-metoxicantin-6-one (*Simarouba versicolor*; Simaroubaceae), (-)-hinokinin and (-) kusunokin (*Virola sebifera*; Myristicaceae), among others. The active substances extracted from these plants may provide the basis for studies aimed at the synthesis of organic molecules and the development of new commercial products that are stable and show low persistence in the environment. In Brazil, these studies intensified after the establishment of restrictive policies by government entities and certifying institutions regarding the use of the active ingredients that are currently available in the market. Several molecules have already been synthesised, although they are not yet available for use by farmers; however, expectations for the use of plant-derived products in the control of leafcutting ants are high.

## 5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos são necessários mais estudos com estas frações visando o isolamento de substâncias que induz a atividade formicida ou fungistática, ou que estimule o crescimento do fungo com a produção de gongilídeos. As frações com atividade formicida podem ser exploradas futuramente como iscas formicidas, devido a necessidade novas substâncias no combate de formigas cortadeiras. Como já verificado com as frações de *C. floribundus*, a mesma fração que apresentou atividade formicida, apresentou também atividade fungistática na formação de gongilídeos, desta forma mais estudos são necessários para verificar se estes gongilídeos interferem na longevidade das formigas cortadeiras. Além disso, substâncias que estimulem o crescimento fúngico com produção de gongilídeos tornam-se de fundamental importância devido o crescimento lento deste fungo em laboratório.



## REFERENCES

- ALMEIDA, R. N. A. et al. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 1-8, Feb. 2007.
- AMBROZIN, A. R. P. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 542-547, May/June 2006.
- ANDRADE, A.P.P. et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, Chicago, v. 40, n. 2, p. 293-306, 2002.
- ANJOS, N. et al. Árvore e formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) em Viçosa, Minas Gerais. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 2, n. 1, p. 1-16, 2008.
- ANJOS, N.; SANTANA, D.L.Q. Alterações deletérias no comportamento de *Atta laevigata* (F. Smmith) e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), causada por folhas de *Eucalyptus* spp. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 25-30, 1994.
- ARAÚJO, M. da S.; DELLA LUCIA, M.T.C.; SOUSA, D.J. de. Estratégias alternativas de controle de formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 1, p. 71-74, nov. 2003.
- ARAÚJO, M. da S. et al. Toxicidade de extratos hexânicos de plantas às operárias de *Atta laevigata* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Formicidae: Attini). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 3/4, p. 106-114, jul./set. 2008.
- AUTUORI, M. **L'instinct dans le comportement de animaux et de l'homme**. Paris: Masson et Cie, 1956. 796 p.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-6, Mar. 1995.

BIAVATTI, M. W. et al. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and x-ray structure of flindersiamine. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 66-70, 2002.

\_\_\_\_\_. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata* x-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, Nov./Dec. 2005.

BICALHO, K. U. et al. Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche: a Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2012, p. 1-7, Apr. 2012.

BIGI, M. F. M. A. et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.

BORBA, R. da S. et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 725-730, maio/jun. 2006.

BOYD, A.M.; MARTIN, M.M. Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 21, p. 1815-1820, Apr. 1975.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p.27-40.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 7 nov. 2010.

BRUGGER, M. S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de extratos hexânicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1958) (Formicidae, Attini). **Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 3, p. 233-238, 2008.

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

\_\_\_\_\_. Utilização de alimento pelas formigas cortadeiras. In: VILELA, E. F. et al. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia à aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2008. p. 19-38.

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**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 107-113, abr. 1997.

CAFFARINI, P. et al. Efectos de extractos acetonicos y acuosos de *Ricinus communis* (Ricino), *Melia azedarach* (Paraíso) y *Trichillia glauca* (Trichillia), sobre la hormiga negra comum (*Acromyrmex lundii*). **Idesia**, Arica, v. 26, n. 1, p. 59-64, abr. 2008.

CANTARELLI, E.B. et al. Efeito de diferentes doses do formicida “citromax” no controle de *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.15, n.3, p. 249-253, 2005.

\_\_\_\_\_. Quantificação das perdas no desenvolvimento de *Pinus taeda* após ataque de formigas cortadeiras. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 39-45, jan./mar. 2008.

CAZAL, C.M. et al. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 19, p. 4307-4312, May 2009.

CINTRA, P. et al. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 347-353, 2005.

DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG: UFV, 1993. p.163-190.

DINIZ, E.A. **Comportamento de preparação do substrato vegetal e cuidado com a rainha de *Atta sexdens***. 2000.37 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

ERTHAL JUNIOR, M. et al. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 152, n. 1, p. 54-59, Jan. 2009.

ERTHAL JUNIOR, M.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 11, p. 1101-1111, Nov. 2007.

\_\_\_\_\_. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 881-891, Oct. 2004.

FEBVAY, G.; KERMARREC, A. Digestion of chitin by the labial gland of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Hymenoptera: Formicidae). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 62, n. 2, p. 229-234, Feb. 1984.

FERNANDES, J.B. et al. Extrações de óleos de sementes de citros e sua atividade sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1091-1095, nov./dez. 2002.

FORTI, L.C. et al. Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p. 102-125.

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

GODOY, M. F. P. et al. Toxicidade de *Pilocarpus grandiflorus* para o fungo simbiote de *Atta sexdens*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 1-306, 2002. Suplemento.

GONÇALVES, C. R. As formigas cortadeiras. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 181, p. 7-23, 1964.

HEBLING, M.J. et al. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hym.; Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 124, n. 1, p. 33-35, Dec. 2000.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **Ants**. Cambridge: Harvard University, 1990. 732 p.

\_\_\_\_\_. **Super organism**: the beauty, elegance and strangeness of insect societies. New York: Norton, 2008. 544 p.

HUBBELL, S.P.; WIEMER, D.F.; ADEJARE, A. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). **Oecologia**, Berlin, v. 60, n. 3, p. 321-327, Dec. 1983.

HUGHES, W.O.H. et al. Antimicrobial defense shows an abrupt evolutionary transition in the fungus-growing ants. **Evolution**, Lancaster, v. 62, n. 5, p. 1252-1257, May 2008.

ISENRING, R.; NEUMEISTER, R. **Insecticides for control of pest insects in FSC certified forests in Brazil**: recommendations by technical advisors. Disponível em: <[http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA\\_Rec\\_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-Fipronil-Sulfluramid\\_BR\\_2010.pdf](http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA_Rec_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-Fipronil-Sulfluramid_BR_2010.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2011.

JAFFÉ, K. **El mundo de las hormigas**. Caracas: Equinoccio, 1993. 183 p.

LACERDA, F.G. et al. Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 100, n. 1, p. 99-103, Feb. 2010.

LEITE, A. C. **Estudos químicos e atividades biológicas de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae)**. 2005. 350f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

LEITE, A. C. et al. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1391-1395, 2005.

LEWIS, T.; NORTON, G. An aerial baiting to control leaf-cutting ants (Formicidae: Atinni) in Trinidad. **Bulletin of Entomology Research**, Farnham Royal, v. 63, n. 2, p. 89-303, Dec. 1973.

LOECK, A.E.; GRUTZMACHER, D. D. Ocorrência de formigas-cortadeiras nas regiões agropecuárias do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 129-133, abr./jun. 2003.

MARICONI, F.A.M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. São Paulo: Nobel, 1981. 122 p.

\_\_\_\_\_. **Saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.

MARINHO, C.G.S. et al. Aggressive response of pest ant species to  $\beta$ -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 445-454, 2006.

\_\_\_\_\_.  $\beta$ -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 117, n. 1, p. 89-93, Oct. 2005.

\_\_\_\_\_. Interference of  $\beta$ -eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 98, n. 5, p. 467-473, Oct. 2008.

\_\_\_\_\_. Voo nupcial ou revoada de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao Manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011.p.165-172.

MARSARO JUNIOR, A. L. et al. Behavioral changes in workers of leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, n. 9, p. 1753-1762, Sept. 2004.

MARTIN, M.M.; CARMAN, R.M.; MACCONNEL, J.G. Nutrients derived from the fungus cultured by the attine ant *Atta colombica tonsipes*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 62, n.1, p. 1386-1387, Jan. 1969.

MARTIN, M.M. et al. Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 12, n. 21, p. 1887-1892, Apr. 1975.

MARTIN, M.M.; GIESELMANN, M.J.; MARTIN, J.S. Rectal enzymes of attine ants:  $\alpha$ -amylase and Chitinase. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 1409-1416, Jan. 1973.

MATRANGOLO, C.A.R. et al. Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 9, p. 952-957, ago. 2010.

MENDES FILHO, J. M. A. **Técnicas de combate à formiga**. Piracicaba: IPEF, 1979. 19 p. (Circular Técnica, 75).

MONTEIRO, M. R. et al. Activity of extracts and fatty acids of *Canavalia ensiformis* (Leguminosae) against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ants *Atta sexdens*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 733-736, 1998.

MOREIRA, D. D. O.; ERTHAL JUNIOR, M.; SAMUELS, R. I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p.205-225.

MORINI, M. S. C. et al. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

PAGNOCCA, F. C. et al. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 120, n. 1/5, p. 317-320, Jan./Dec. 1996a.

\_\_\_\_\_. Syntetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. **Journal of Agricultural and Entomology**, Clemson, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2006.

\_\_\_\_\_. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 7, p. 1325-1330, July 1996b.

\_\_\_\_\_. Toxicity of sesame extract to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 80, n. 3, p. 349-352, July 1990.

PEÑAFLORES, M. F. G. V. et al. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 1-9, Nov. 2009.

PERES-FILHO, O.; DORVAL, A. Efeito de formulações granuladas de diferentes produtos químicos e a base de folhas e de sementes de gergelim, *Sesamum indicum*, no controle de formigueiros *Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 67-70, dez. 2003.

QUILAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, London, v. 2, n. 2, p. 161-170, May 1977.

REIS FILHO, W. et al. Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 65, p. 37-42, jan./mar. 2011.

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

RIBEIRO, S.B. et al. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 421-426, Sept. 1998.

RONHEDE, S.B.J.J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 101-106, Jan. 2004.

SANTOS-OLIVEIRA, M.E.S. et al. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 423-431, 2006.

SHNEIDER, M.O. **Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2003. 80 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2003.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, Apr. 2003.



SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, June 2004.

SIQUEIRA, C. G. de et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, Dec. 1998.

SOUZA, D.M.; PERES FILHO, A.D.; DORVAL, A. Efeito de extratos naturais de folhas vegetais em *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, (Agaricales: Agaricaceae). **Ambiência**, Guarapuava, v. 7, n. 3, p. 461-471, set./dez. 2011.

TEREZAN, A. P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 882-886, Sept. 2010.

VALDERRAMA-ESLAVA, E.I.; MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO, C. Enforced herbivory on *Canavalia ensiformis* and *Tithonia diversifolia* and its effects on leaf-cutting ants, *Atta cephalotes*. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 133, n. 9/10, p. 689-694, June 2009.

VICTOR, R.S. et al. Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 7, p. 603-608, July 2001.

VIEIRA, A. S.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. The functional morphology of the metapleural gland of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Micron**, New York, v. 41, n. 2, p. 149-157, Feb. 2010.

VILLESSEN, P. et al. Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. **Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, London, v. 269, n. 1500, p. 1541-1548, July 2002.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University, 1971. 548 p.

ZANETTI, R. et al. **Manejo integrado de formigas cortadeiras**. Lavras:

UFLA, 2002. 16p. Disponível em:

<<http://www.den.ufla.br/siteantigo/Professores/Ronald/Disciplinas/Notas%20Aula/MIPFlorestas%20formigas.pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2010.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C. Monitoramento de formigas cortadeiras em florestas cultivadas no Brasil. **Plagas Forestales Neotropicales**, Ciudad del México, v. 17, n. 75, p. 90-92, ago. 2005.

ZANUNCIO, J.C. et al. Aferição de dosagens de iscas granuladas para controle de *Atta laevigata* (F. Smith) pelo número de olheiros ativos. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 2, p. 241-246, abr./jun. 1996.

ZAVAN, C. **Identificação de inibidores de pectinase fúngica para o controle de formigas cortadeiras**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.

**CAPÍTULO 2 Toxicidade de extratos vegetais para *Atta sexdens rubropilosa*  
F. (Hymenoptera: Formicidae)**

**RESUMO**

Formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* são herbívoros generalistas e importantes pragas em toda a região neotropical. O inseticida mais utilizado no seu controle é a sulfluramida. No entanto, devido à sua toxicidade, ela é alvo de restrição de uso, por isso é necessário desenvolver novos produtos para o controle destas formigas. O objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade de extratos vegetais em condições de laboratório para possível uso em iscas tóxicas contra *Atta sexdens rubropilosa* Linnaeus (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. Os experimentos consistiram de extratos vegetais de nove espécies de plantas: *Croton floribundus*, *C. urucurana*, *Erythrina falcata*, *Eugenia handroana*, *Gymnanthes concolor*, *Myrsine ferruginea*, *Siparuna guianensis*, *Trichilia catigua* e *Zanthoxylum pohlianum* e de duas testemunhas, uma sem e outra com sulfluramida (0,3%). Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, sendo cada uma composta por 20 formigas por placa de Petri. Avaliaram-se três concentrações dos extratos vegetais: 200, 400 e 600 mg do extrato vegetal por grama de polpa cítrica. A aplicação dos tratamentos foi feita através da adição de 2 g de uma pasta de polpa cítrica e sacarose. Estas formulações foram removidas depois de 24 horas, e foi acrescida dieta artificial. A mortalidade das formigas foi avaliada no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º, 13º, 15º, 17º, 19º e 21º dias depois da aplicação. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Os extratos vegetais de folhas de *M. ferruginea* e *S. guianensis* não apresentaram atividade formicida. Já os extratos vegetais de *C. floribundus* (folha e casca), *C. urucurana* (folha), *E. handroana* (folha), *E. falcata* (folha), *G. concolor* (folha), *T. catigua* (casca) e *Z. pohlianum* (folha) apresentaram atividade formicida, em testes *in vitro* via ingestão devem ser melhor investigados para futuro uso em iscas comerciais.

Palavras-chave: Formigas cortadeiras. Extrato de planta. Controle químico. Controle de pragas. Bioensaio de ingestão.

## ABSTRACT

Leafcutter ants, which belong to the genera *Atta* and *Acromyrmex* are generalist herbivores and important pest throughout the neotropical region. The most widely used insecticide to control that pests is sulfluramid. However, due to its toxicity it is under use restriction, being necessary therefore to develop new products to control these ants. The objective of this study was to evaluate the toxicity of plant extracts under laboratory conditions to be used in the future in toxic baits against *Atta sexdens rubropilosa* Linnaeus (Hymenoptera: Formicidae) under laboratory conditions. The experiments consisted of nine plant extracts: *Croton floribundus*, *C. urucurana*, *Erythrina falcata*, *Eugenia handroana*, *Gymnanthes concolor*, *Myrsine ferruginea*, *Siparuna guianensis*, *Trichilia catigua*, and *Zanthoxylum pohlianum*, as well as two controls: with or without sulfluramid (0.3%). For each treatment, there was six replicates with 20 ants per Petri dishes. We evaluated three concentrations of plant extracts: 200, 400, and 600 mg of herbal extract per gram of dried citrus pulp. The application was performed by adding 2 g of a paste composed by citrus pulp and saccharose. These formulations were removed after 24 hours and replaced for artificial diet. Mortality ants were assessed at 1<sup>th</sup>, 2<sup>th</sup>, 3<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup>, 19<sup>th</sup>, and 21<sup>th</sup> days after application. Data were analyzed for survival using Weibull distribution. Plant extracts (leaves) of *M. ferruginea* and *S. guianensis* did not show formicide activity. However, extract plant of *C. floribundus* (bark and leaves), *C. urucurana* (leaves), *E. handroana* (leaves), *E. falcata* (leaves), *G. concolor* (leaves), *T. catigua* (bark) and *Z. pohlianum* (leaves) had an ant activity through *in vitro* tests via ingestion. Further investigations need to be executed with these plant extracts in order to use it in the future as commercial baits.

Keyword: Leafcutter ants. Plant extract. Chemical control. Pest management. Feed intake bioassay.

## 1 INTRODUÇÃO

Formigas cortadeiras do gênero *Atta* Fabriciuse *Acromyrmex* Mayr (Hymenoptera: Formicidae) são herbívoros generalistas e importantes pragas em toda a região neotropical (FORTI; BOARETTO, 1997). Estes gêneros são encontrados amplamente distribuídos (florestas subtropicais, tropicais e equatoriais úmidas ou secas, cerrados, pampas, desertos, caatingas, restingas) e se adaptam facilmente a ambientes nativos, áreas fortemente antropizadas ou intensas atividades agrícolas (DELABIE et al., 2011).

Um dos fatores que confere sucesso a esse grupo de organismos é a associação mutualística entre as formigas e o fungo simbionte basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. De acordo com Silva-Pinhati et al. (2004), essa relação simbiótica entre as espécies de *Atta* e *Acromyrmex* com o fungo existe a mais de 50 milhões de anos. A relação envolve complexas interações entre os dois organismos, sendo o fungo responsável por fornecer as formigas nutrientes facilmente assimilados derivados de plantas. As formigas por sua vez fornecem um ambiente protegido ao fungo pela remoção de contaminantes e secreção de substâncias antibióticas, tais como o ácido fenilacético pelas glândulas metapleurais (DELLA LUCIA; MARINHO; RIBEIRO, 2008; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; VIEIRA; BUENO; CAMARGO-MATHIAS, 2010).

O inseticida mais utilizado no controle de formigas cortadeiras é a sulfluramida, que tem como precursor o sulfonato de perfluorooctano (PFOS) (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME- UNEP, 2007). Este composto é extremamente persistente e tem propriedade de bioacumulação e biomagnificação, além de ser facilmente transportado a longas distâncias (UNEP, 2010). Nos termos da Convenção de Estocolmo, o sulfonato de

perfluorooctano será restrito (ou pode, eventualmente, ser proibido) em algum momento (UNEP, 2007). O uso de sulfluramida para o controle de formigas deve ser substancialmente reduzido para diminuir o influxo de sulfluramida ao ambiente e acumulação gradual em animais silvestres e humanos.

Dentre os produtos que estão sendo estudados para o desenvolvimento de novos produtos com atividade formicida, destacam-se os extratos de plantas. Substâncias ativas foram isoladas de algumas famílias de plantas, tais como a ricinina (*Ricinus communis* L.; Euphorbiaceae) (BIGI et al., 2004), â-eudesmol (*Eucalyptus maculata* Hook; Myrtaceae) (MARSARO JUNIOR et al., 2004), o limonoide ácido limonéxico (*Raulinoa echinata* Reitz; Rutaceae) (BIAVATTI et al., 2005), sesamoline e sesamina (*Sesamum indicum* L.; Pedaliaceae) (MORINI et al., 2005), ácido antranílico, kokusaginina e dictamina (*Helietta puberula* RE Fr; Rutaceae) (ALMEIDA et al., 2007), 4,5- dimetoxicantin-6-ona e 5-metoxicantin-6-ona (*Simarouba versicolor* St. Hill; Simaroubaceae) (PEÑAFLORES et al., 2009); (-)-hinoquinina e (-)-kusunokin (*Virola sebifera* Aubl., Myristicaceae) (BICALHO et al., 2012), entre outras. Tais substâncias apresentaram atividade formicida e/ou fungicida.

Em estudo preliminar realizado pelo grupo de pesquisa de Produtos Naturais e Manejo Integrado de Pragas Florestais da UFLA com 405 espécies de plantas do Cerrado de Minas Gerais, constatou-se a ação formicida dos extratos vegetais de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae), *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae), *Gymnanthes concolor* Spreng. (Euphorbiaceae), *Erythrina falcata* Benth. (Fabaceae), *Eugenia handroana* D. Legrand (Myrtaceae), *Myrsine ferruginea* Spreng. (Myrsinaceae), *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae), *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae) e *Zanthoxylum pohlianum* Engl. (Rutaceae) quando os mesmos foram oferecidos via ingestão para as operárias (dados não publicados), porém não foi estudado o potencial do uso dos extratos destas plantas como iscas formicidas. Por isso, o objetivo com

esse trabalho foi avaliar a toxicidade de extratos vegetais para possível uso em iscas tóxicas para *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparo dos extratos

Foram avaliadas nove espécies de plantas: *Croton floribundus* (folha e casca), Família Euphorbiaceae, coletada no Viveiro Florestal da UFLA/Lavras, Minas Gerais (04/2011), Número de Registro (NR) 26941; *Croton urucurana* (folha), Família Euphorbiaceae, coletada no campus da UFLA, Minas Gerais (10/2011), NR 26922; *Erythrina falcata* (casca e folha), Família Fabaceae, coletada na UFLA (08/2010), NR 25261; *Eugenia handroana* (casca e folha), Família Myrtaceae, coletada em Perdões (11/2010), NR 25260; *Gymnanthes concolor* (folha), Família Euphorbiaceae, coletada na mata da sub-estação (05/2011), NR 26282; *Myrsine ferruginea* (casca), Família Myrsinaceae, coletada em Perdões (04/2011), NR 26280; *Zanthoxylum pohlianum* (folha), Família Rutaceae, coletada na Mata da sub-estação/UFLA, NR 26281; *Siparuna guianensis* (folha), Família Siparunaceae, coletada na UFLA (10/2011), NR 27124; *Trichilia catigua* (casca), Família Meliaceae, coletada na Mata da UFLA (04/2011), sem NR. O material botânico coletado foi identificado e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Esal com os números de registros descritos acima.

Os materiais vegetais coletados foram secos em estufa de ventilação forçada, a 40 °C, separadamente durante 48 horas, moídos e armazenados em freezer (-14 °C) até a realização das extrações. Misturaram-se 100 g de pó seco moído de cada extrato vegetal em um volume de 300 mL de metanol (P.A.), e manteve-se cada mistura resultante em temperatura ambiente por 24 horas, para a extração do máximo possível de substâncias dos tecidos vegetais, cada mistura foi filtrada com algodão hidrófilo e submeteu-se o resíduo resultante a mais sete



extrações com metanol, empregando-se o mesmo procedimento. Após a última extração adicionaram-se mais 50 mL do solvente metanol para lavar o resíduo insolúvel. As suspensões correspondentes a mesma amostra vegetal foram combinadas e se removeu o solvente em evaporador rotatório. Os resíduos obtidos foram totalmente secos por liofilização e armazenados em freezer a -10 °C.

## **2.2 Bioensaio com as formigas cortadeiras**

Os testes foram realizados segundo a metodologia adaptada de Nagamoto et al. (2004). No laboratório de Manejo Integrado Florestal da UFLA existem seis ninhos adultos já estabelecidos, os quais são mantidos em sala climatizada, com temperatura de  $21 \pm 2$  °C, 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de  $70\% \pm 5$ . Nos bioensaios de toxicidade *in vitro* de ingestão, utilizaram-se operárias de *Atta sexdens rubropilosa* retiradas dos mesmos ninhos adultos, sendo estes ninhos adultos revezados em cada bioensaio.

Nos experimentos foram utilizadas operárias de tamanho médio, cujas massas variaram entre 10 e 20 mg, e cápsulas cefálicas entre 2,0 e 2,8 mm. Utilizou-se 10 exemplares de formigas cortadeiras, as quais a cápsula cefálica foi medida com auxílio de um microscópio óptico e as mesmas foram pesadas e guardadas em frascos de vidro. Estas foram utilizadas como base para a coleta de novas operárias.

Para a condução dos experimentos se utilizou polpa cítrica, a qual é utilizada em iscas comerciais com a finalidade de tornar o produto mais palatável para as formigas. Para prepará-lo, o bagaço da laranja foi desidratado em estufa por três dias a 40 °C e, em seguida foi triturado em liquidificador por várias vezes e passado em uma malha fina (0,50 mm) até ficar com o aspecto de

um pó. Este correspondeu ao que doravante será chamado simplesmente de polpa cítrica.

Os extratos vegetais (200, 400 e 600 mg) foram dissolvidos em  $\pm 30$  mL de metanol (P.A.) e posteriormente misturados com 6 g de pó da polpa cítrica. Removeu-se o solvente da mistura em evaporador rotatório, e adicionou-se solução de sacarose a 10% ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), até que fosse obtida uma pasta homogênea ( $\pm 20$  mL).

A testemunha sem ingrediente ativo consistiu de polpa cítrica (6 g) suspensa em metanol (P.A.), o qual foi removido como descrito anteriormente. Ao resíduo obtido foi adicionada solução de sacarose a 10% ( $\pm 20$  mL) até formar a pasta palatável homogênea. Para a testemunha com ingrediente ativo, dissolveram-se 60 mg de sulfluramida técnica a 93%, em 15 mL de acetona, posteriormente foi adicionado a polpa cítrica (20 g) até que a concentração final de sulfluramida fosse de 0,28% (m/m) (ingrediente ativo com ação retardada), aproximadamente 0,3% (m/m).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada experimento composto pelos tratamentos correspondentes as concentrações de cada extrato vegetal e as duas testemunhas (uma sem ingrediente ativo e a outra com o ingrediente ativo sulfluramida). Foram utilizadas seis repetições por tratamento sendo cada uma composta por 20 formigas que foram colocadas em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro, forrada com papel filtro. Cada placa recebeu 2 g da formulação (pasta), que foi removida depois de 24 horas por dieta artificial (BUENO et al., 1997), em pedaços de  $\pm 1$   $\text{cm}^2$  durante todo o período de avaliação.

A mortalidade das formigas foi avaliada ao 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias após o oferecimento da polpa cítrica contaminada as formigas. Todos os experimentos foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de  $21 \pm 2$  °C, 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de

70%±5. Posteriormente, os dados de número de formigas mortas por dia foram submetidos à análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Realizou-se ainda o teste de contraste para verificar semelhança entre os tratamentos, criando-se grupos de efeitos semelhantes ( $\chi^2$ ;  $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005) e do pacote estatístico Survival (THERNEAU, 2011).

### 3 RESULTADOS

Os extratos brutos vegetais de *Croton floribundus* (casca e folha), *C. urucurana* (folha), *E. handroana* (folha), *E. falcata* (casca), *G. concolor* (folha), *T. catigua* (casca) e *Z. pohliatum* (folha) apresentaram ação formicida (Tabela 1).

A curva de mortalidade do extrato vegetal de folhas de *C. floribundus*, em sua menor concentração testada (200 mg do extrato vegetal por grama de polpa cítrica) foi semelhante à testemunha sem ingrediente ativo (Figura 1). A mortalidade foi de 2,93% em 24 horas e de 60,55% aos 21 dias de avaliação,  $TL_{50}$  foi igual a 16,2 dias. Observou-se atividade formicida nas maiores concentrações (400 e 600 mg/g de polpa cítrica), com variações entre 5,94% (24 horas) e 85,23% (aos 21 dias) nas curvas de mortalidade, e  $TL_{50}$  igual a 8,6 dias. A testemunha com ingrediente ativo apresentou elevada mortalidade (99,85%) aos 21 dias, e baixo valor de  $TL_{50}$  (2,9 dias) (Figura 1; Tabela 1).

Tabela 1 Tempo letal mediano (TL<sub>50</sub>) \*, concentração utilizada, valores de  $\alpha$  e  $\beta^{**}$  e Mortalidade (%) de operárias de (*Atta sexdens rubropilosa*) submetidas aos bioensaios de ingestão de diferentes extratos vegetais de plantas

Extrato vegetal	Parte testada	Concentração mgg <sup>-1</sup>	Tempo Letal Mediano (TL <sub>50</sub> )	Valores de $\alpha$	Valores de $\hat{\alpha}$	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
							24 h	21 dias
Sulfloramida		0,3%	2,9	1,13	3,97	8,59e-66	18,98	99,85
Testemunha		-	16,2	1,13	22,39	8,17e-57	2,93	60,55
<i>Croton floribundus</i>	Folha	200	16,2	1,13	22,39	8,17e-57	2,93	60,55
		400	8,6	1,13	11,83	2,12e-26	5,94	85,23
		600	8,6	1,13	11,83	2,12e-26	5,94	85,23
Sulfloramida		0,3%	3,1	1,29	4,1	2,49e-88	14,95	99,97
Testemunha		-	17,3	1,29	22,89	3,60e-48	1,74	59,13
<i>Croton floribundus</i>	Casca	200	6,3	1,29	8,33	5,50e-12	6,28	96,29
		400	13,4	1,29	17,69	1,29e-40	2,42	71,28
		600	1,65	1,29	2,16	1,66e-10	30,94	100,00
Sulfloramida		0,3%	2,8	1,27	5,04	1,98e-112	12,03	99,78
Testemunha		-	>21	1,27	43,16	6,00e-49	0,83	33,00
<i>Croton urucurana</i>	Folha	200	19,5	1,27	26,23	7,48e-60	1,78	53,26
		400	19,5	1,27	26,23	7,48e-60	1,78	53,26
		600	6,5	1,27	8,68	5,09e-07	6,76	94,84
Sulfloramida		0,3%	4,9	1,34	6,43	2,53e-153	7,92	99,24
Testemunha		-	18,8	1,34	24,19	5,35e-29	1,38	56,28
<i>Erythrina falcata</i>	Casca	200	7,4	1,34	9,64	3,93e-05	4,68	94,14
		400	11,2	1,34	14,7	9,94e-16	2,69	80,06
		600	1,3	1,34	1,74	8,24e-41	37,87	100

“Tabela 1, continuação”

Extrato vegetal	Parte testada	Concentração m <sub>g</sub> g <sup>-1</sup>	Tempo Letal Mediano (TL <sub>50</sub> )	Valores de á	Valores de â	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
							24 h	21 dias
Sulfluramida		0,3%	2,3	1,21	3,12	1,14e-99	22,30	99,99
Testemunha			18,5	1,21	24,92	2,93e-70	2,02	55,64
<i>Eugenia handroana</i>	Folha	200	4,3	1,21	5,71	5,19e-15	11,43	99,20
		400	4,3	1,21	5,71	5,19e-15	11,43	99,20
		600	2,3	1,21	3,12	1,14e-99	22,30	99,99
Sulfluramida		0,3%	7,2	1,05	10,18	0,001e-15	8,37	88,22
Testemunha		-	>21	1,05	50,94	6,17e-23	1,59	32,59
<i>Gymnanthes concolor</i>	Folha	200	13,9	1,05	19,67	5,32e-08	4,28	65,73
		400	7,2	1,05	10,18	0,001e-01	8,37	88,22
		600	7,2	1,05	10,18	0,001e-01	8,37	88,22
Sulfluramida		0,3%	11,1	2,29	12,97	0,001e-01	0,28	95,09
Testemunha		-	>21	2,29	30,72	2,60e-34	0,03	34,19
<i>Myrsine ferruginea</i>	Casca	200	>21	2,29	30,72	2,60e-34	0,03	34,19
		400	>21	2,29	44,25	4,55e-38	0,01	16,59
		600	>21	2,29	44,25	4,55e-38	0,01	16,59
Sulfluramida		0,3%	10	1,59	12,59	0,001e-01	1,76	89,52
Testemunha		-	21	1,59	26,2	1,52e-20	0,55	50,51

“Tabela 1, conclusão”

Extrato vegetal	Parte testada	Concentração m $g g^{-1}$	Tempo Letal Mediano (TL $_{50}$ )	Valores de $\alpha$	Valores de $\hat{\alpha}$	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
							24 h	21 dias
<i>Siparuna guianensis</i>	Folha	200	21	1,59	26,2	1,52e-20	0,55	50,51
		400	21	1,59	26,2	1,52e-20	0,55	50,51
		600	21	1,59	26,2	1,52e-20	0,55	50,51
Sulfloramida Testemunha		0,3%	5,3	0,87	8,04	2,24e-221	15,04	90,02
		-	18	0,87	28,3	2,97e-24	5,31	53,76
<i>Trichilia catigua</i>	Casca	200	18	0,87	28,3	2,97e-24	5,31	53,76
		400	5,3	0,87	8,04	2,24e-221	15,04	90,02
		600	5,3	0,87	8,04	2,24e-221	15,04	90,02
Sulfloramida Testemunha		0,3%	6	1,01	8,5	1,72e-118	10,87	91,73
		-	>21	1,01	33,98	7,42e-20	2,80	45,93
<i>Zanthoxylum pohlianum</i>	Folha	200	16,4	1,01	23,56	3,21e-13	4,02	58,94
		400	3,6	1,01	5,04	7,05e-06	17,73	98,53
		600	3,6	1,01	5,04	7,05e-06	17,73	98,53

\*Tempo Letal Mediano (TL $_{50}$ ) é o tempo necessário de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste; \*\* $\alpha$ =parâmetro de forma e  $\beta$  parâmetro de escala; P=probabilidade.

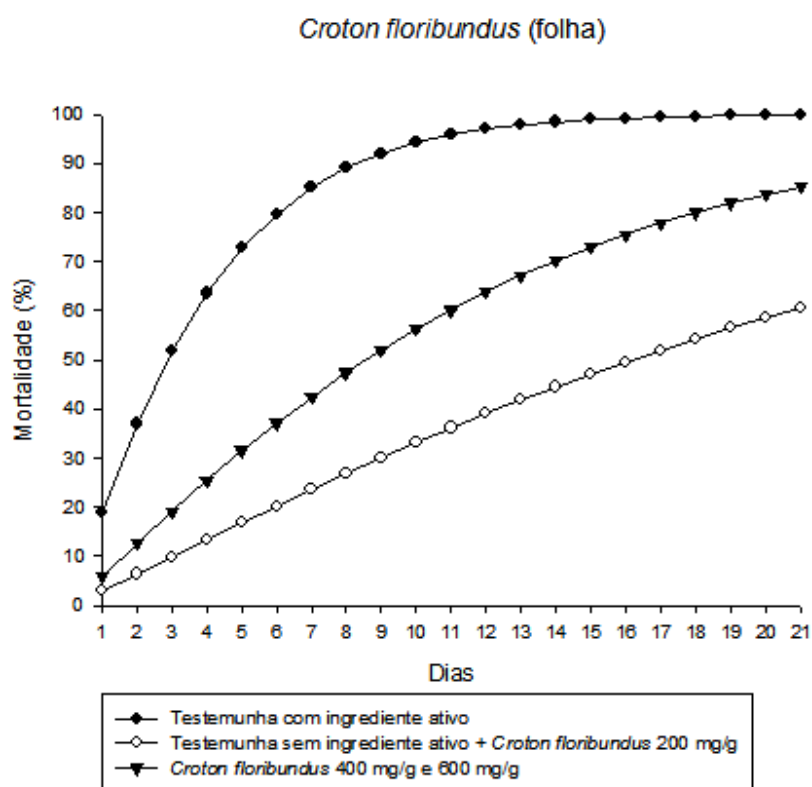


Figura 1 Toxicidade do extrato vegetal de *Croton floribundus* (folha) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

Com relação ao extrato vegetal de cascas de *C. floribundus*, verificou-se diferença entre as três concentrações avaliadas. A melhor atividade formicida foi observada na menor concentração (200 mg/g de polpa cítrica), a qual apresentou ação retardada nas primeiras 24 horas (6,28%), mortalidade maior que 96% após 21 dias de avaliação e  $TL_{50}$  igual a 6,3 dias. Já na concentração de 400 mg por g de polpa cítrica, a mortalidade foi baixa em 24 horas (2,42%) e após 21 dias (71,28%), enquanto o tempo letal mediano foi mais elevado (13,4 dias). A maior



concentração deste extrato vegetal (600 mg/g de polpa cítrica) apresentou elevada mortalidade em 24 horas (30,94%) e aos 21 dias de avaliação (100%) e menor valor de  $TL_{50}$  (1,65 dias). As testemunhas sem e com ingrediente ativo sulfluramida também apresentaram curvas de mortalidade distintas, sendo que as mortalidades variaram entre 1,74% e 14,95% após 24 horas e 59,13% e 99,97% após 21 dias,  $TL_{50}$ =22,89 dias e  $TL_{50}$ =4,1 dias, respectivamente (Tabela 1, Figura 2).

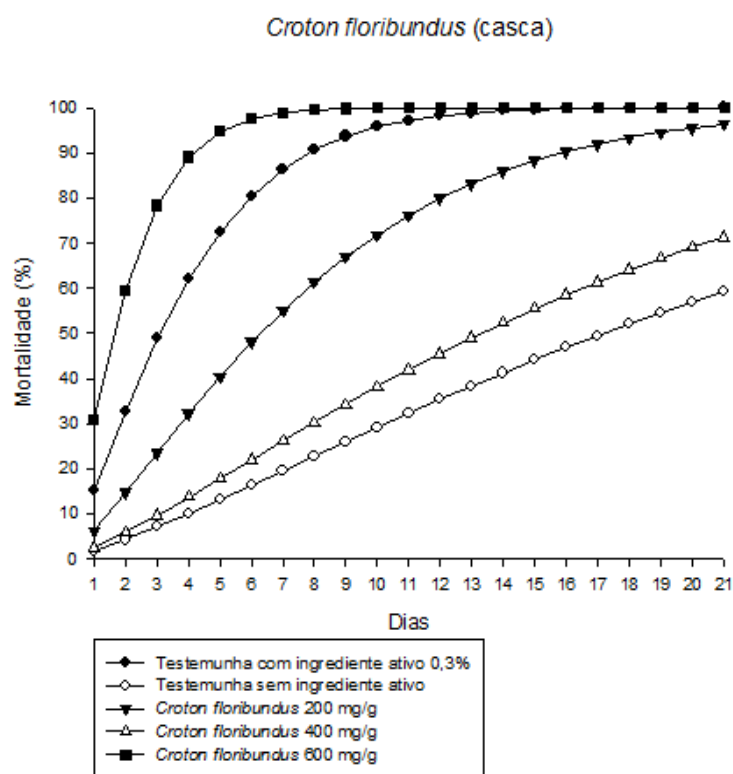


Figura 2 Toxicidade do extrato vegetal de *Croton floribundus* (casca) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O extrato vegetal de folhas de *C. urucurana* apresentou atividade formicida na maior concentração testada (600 mg/g de polpa cítrica), a mortalidade foi de 6,76% em 24 horas e 94,84% após 21 dias de avaliação,  $TL_{50}$  igual a 6,5 dias (Tabela 1). A curva de mortalidade das menores concentrações (200 e 400 mg/g de polpa cítrica) foram semelhantes, com mortalidade variando entre 1,78% (24 horas) e 53,26% (21 dias),  $TL_{50}$  igual a 19,5 dias (Tabela 1). A testemunha sem ingrediente ativo apresentou baixa mortalidade em 24 horas (0,83%) e após 21 dias (33%),  $TL_{50} > 21$  dias (Tabela 1). Já a testemunha com ingrediente ativo apresentou baixa mortalidade em 24 horas (12,03%) e elevada após 21 dias (99,78%),  $TL_{50} = 2,8$  dias (Tabela 3).

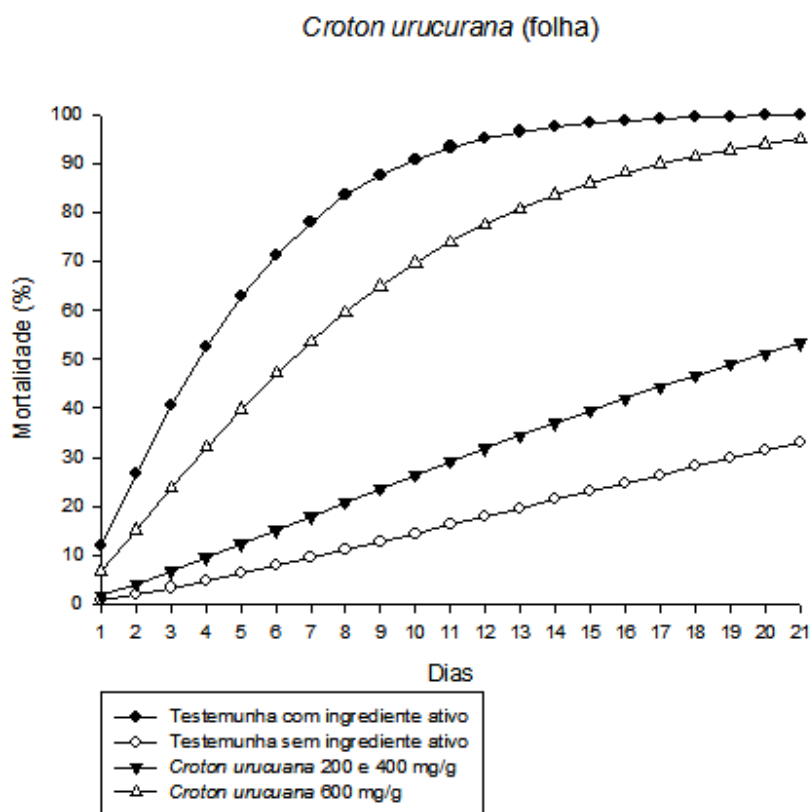


Figura 3 Toxicidade do extrato vegetal de *Croton urucurana* (folha) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A curva de mortalidade do extrato vegetal de folhas de *E. handroana* na maior concentração (600 mg/g de polpa cítrica) foi semelhante a testemunha sulfluramida (0,3%). A mortalidade foi elevada em 24 horas (22,30%) e após 21 dias de avaliação (99,99%),  $TL_{50}=2,3$  dias (Tabela 1). A mortalidade foi retardada nas menores concentrações do extrato vegetal (200 e 400 mg/g de polpa cítrica), 11,43% em 24 horas e 99,20 após 21 dias,  $TL_{50}$  igual a 4,3 dias

(Tabela 1). A testemunha com ingrediente ativo diferiu dos demais tratamentos, a mortalidade variou entre 2.02% (24 horas) e 55,64% (após 21 dias),  $TL_{50}$  igual a 24 dias (Figura 4).

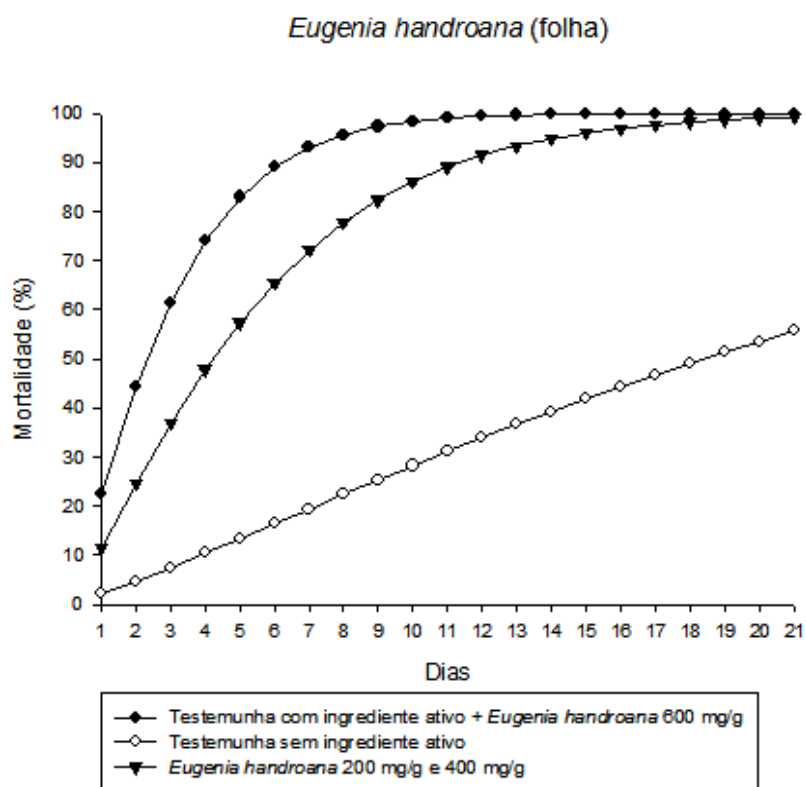


Figura 4 Toxicidade do extrato vegetal de *Eugenia handroana* (folha) (Myrtaceae) oferecidos via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O extrato vegetal de casca de *Erythrina falcata* apresentou diferença significativa entre as curvas de mortalidade, desta forma foi possível observar cinco curvas distintas. A concentração com maior potencial formicida é a de 200

mg/g de polpa cítrica, esta apresentou baixa mortalidade nas primeiras 24 horas (4,68%) e mais de 94% após 21 dias de avaliação,  $TL_{50}$  igual a 7,4 dias. A concentração de 400 mg/g de polpa cítrica, a mortalidade foi de 2,69% em 24 horas e de 80,06% aos 21 dias de avaliação,  $TL_{50}$  igual a 1,2 dias. Observou-se na concentração de 600 mg/g de polpa cítrica, em que a mortalidade foi elevada nas primeiras 24 horas (37,87%) e no final dos 21 dias (100%),  $TL_{50}$  igual a 1,3 dias. A curva de mortalidade da testemunha com ingrediente ativo apresentou-se baixa após 24 horas (7,92%) e elevada aos 21 dias (99,24%),  $TL_{50}$  igual a 4,9 dias. Já a testemunha sem ingrediente ativo, a mortalidade foi baixa após 24 horas (1,38%) e aos 21 dias (56,28%), com  $TL_{50}$  igual a 18,8 dias (Tabela 1, Figura 5).

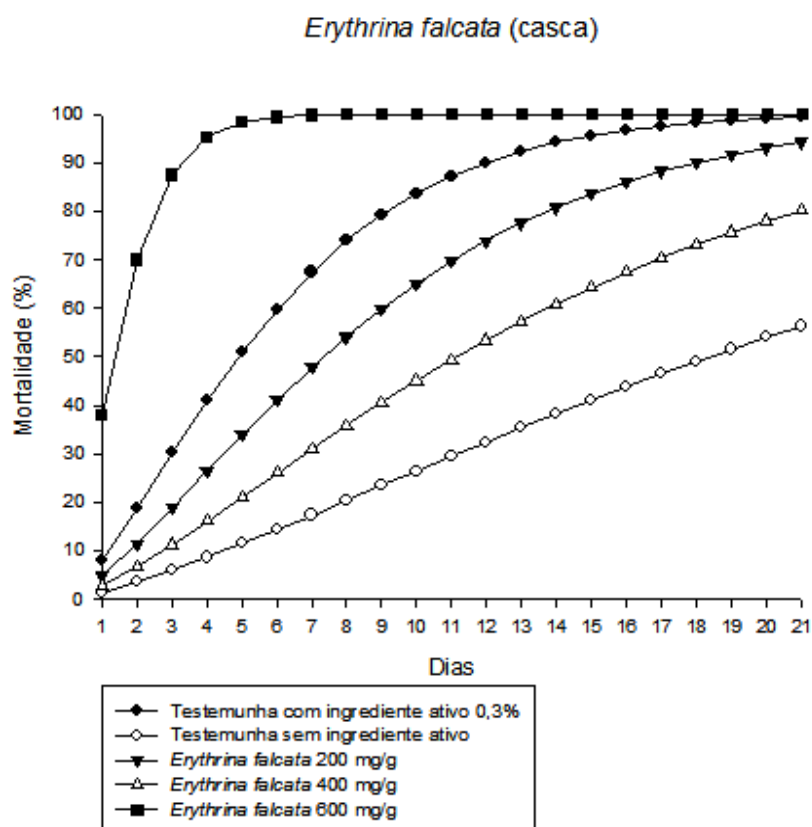


Figura 5 Toxicidade do extrato vegetal de *Erythrina falcata* (casca) (Fabaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O extrato vegetal de folhas de *G. concolor*, nas concentrações de 400 e 600 mg/g de polpa cítrica apresentaram curva de mortalidade semelhante à testemunha com sulfluramida (0,3%). A mortalidade foi de 8,37% em 24 horas e 88,22% após 21 dias de avaliação,  $TL_{50}$  igual a 7,2 dias (Figura 6). Já a menor concentração avaliada (200 mg/g de polpa cítrica) apresentou baixa mortalidade

em 24 horas (4,28%) e após 21 dias (65,73%),  $TL_{50}$  igual a 13,9 dias. A testemunha sem ingrediente ativo diferiu dos demais tratamentos, e a mortalidade variou entre 4,28% (24 horas) e 65,73% (após 21 dias),  $TL_{50}$ =13,9 dias (Tabela 1).

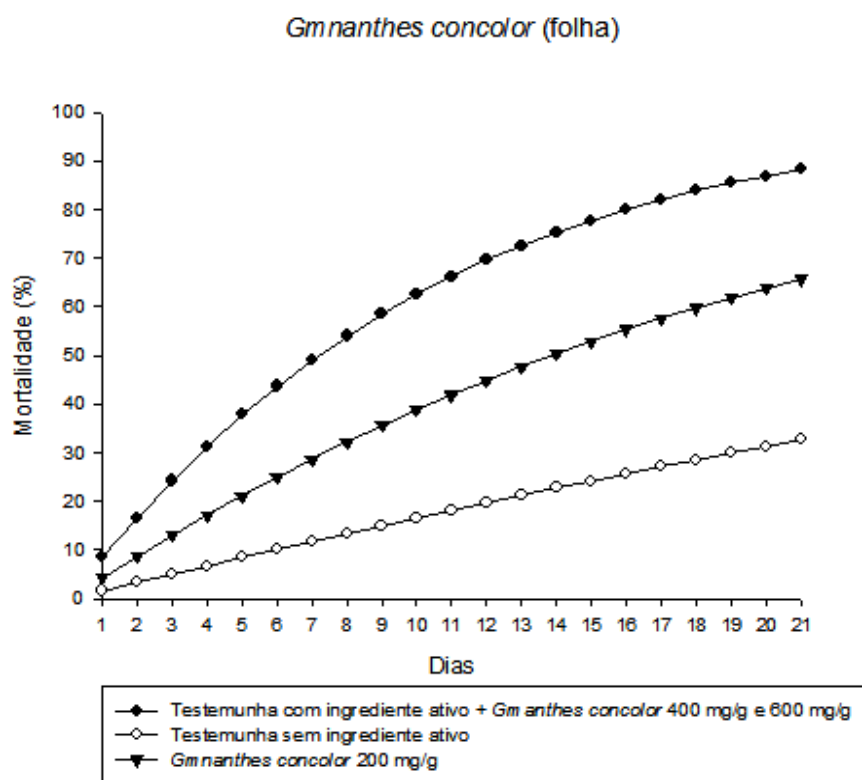


Figura 6 Toxicidade do extrato vegetal de *Gymnanthes concolor* (folha) (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A curva de mortalidade do extrato vegetal de casca de *T. catigua*, nas maiores concentrações (400 e 600 mg/g de polpa cítrica) foi semelhante a

testemunha com ingrediente ativo sulfluramida (0,3%) (Figura 7). A mortalidade foi de 15,04% (24 horas) e 90,02% (após 21 dias), TL<sub>50</sub> igual a 5,03 dias, respectivamente. A curva de mortalidade da testemunha sem ingrediente ativo e o extrato vegetal de *T. catigua*, na concentração de 200 mg/g de polpa cítrica também foram semelhantes, mortalidade de 5,31% em 24 horas e 53,76% aos 21 dias de avaliação, TL<sub>50</sub> igual a 18 dias (Tabela 1).

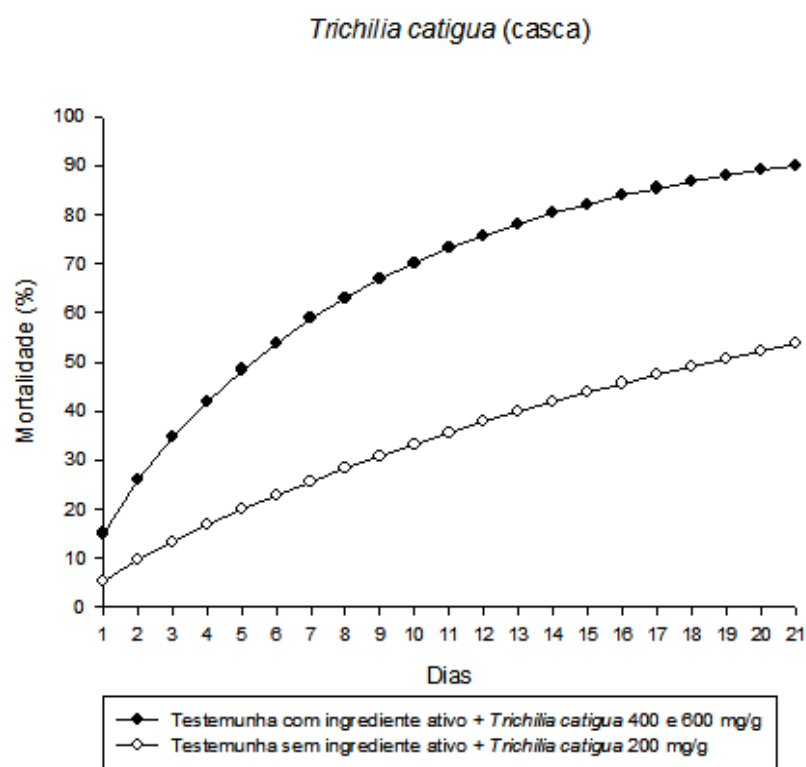


Figura 7 Toxicidade do extrato vegetal de *Trichilia catigua* (casca) (Meliaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O extrato vegetal de folha de *Zanthoxylum pohlianum*, nas concentrações de 400 e 600 mg/g de polpa cítrica apresentaram ação rápida, com



mortalidade maior 17% em 24 horas e 98,53% em 21 dias. A concentração de 200 mg/g de polpa cítrica não teve potencial formicida devido à baixa mortalidade ao longo do tempo (58,94%). A menor concentração apresentou elevado  $TL_{50}$  (16,4 dias), já as maiores concentrações (400 e 600 mg/g de polpa cítrica) esse tempo foi reduzido para 3,6 dias. A testemunha sem ingrediente ativo apresentou baixa mortalidade em 24 horas (2,80%) e após 21 dias (45,93%),  $TL_{50}>21$  dias. Já a testemunha com ingrediente ativo, a mortalidade foi baixa em 24 horas (10,87%) e elevada após 21 dias (91,73%),  $TL_{50}$  igual a 6 dias (Tabela 1, Figura 8).

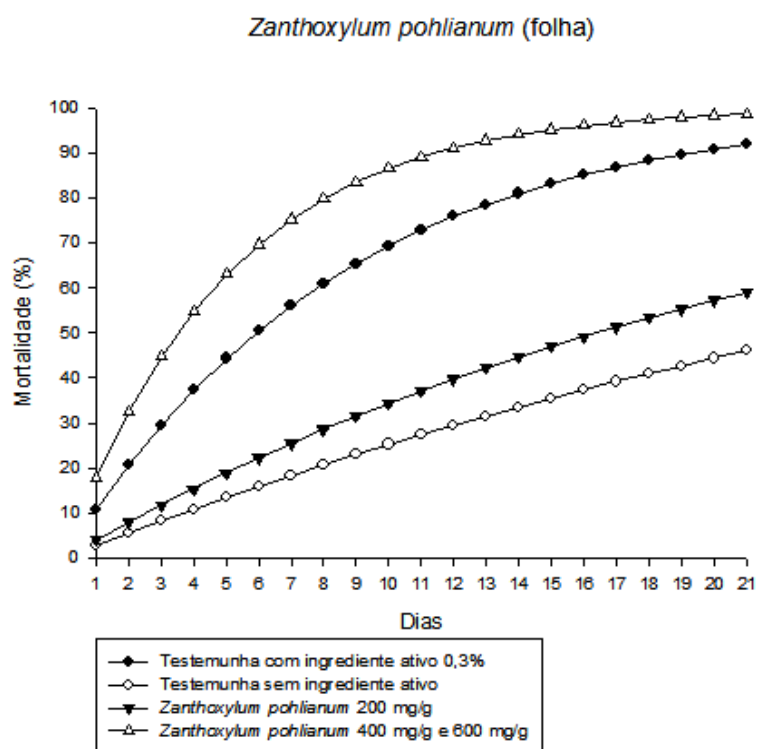


Figura 8 Toxicidade do extrato vegetal de *Zanthoxylum pohlianum* (folha) (Rutaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens*

(Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

Dentre todos os extratos vegetais testados apenas dois não apresentaram atividade formicida, *Myrsine ferruginea* e *Siparuna guianensis* (Tabela 1). A curva de mortalidade da menor concentração (200 mg por grama de polpa cítrica) do extrato vegetal de *M. ferruginea* e da testemunha sem ingrediente ativo foram semelhantes, com mortalidade de 0,03 às 24 horas e 34,19% aos 21 dias de avaliação,  $TL_{50} > 21$  dias. Já a curva de mortalidade das maiores concentrações (400 e 600 mg/g de polpa cítrica) foram grupos congêneres, e apresentaram baixa mortalidade aos 21 dias de avaliação (<17%), com  $TL_{50} > 21$  dias. A mortalidade da testemunha com ingrediente ativo foi de 0,28% (24 horas) e 95,09% (21 dias), com  $TL_{50}$  igual a 11 dias (Figura 9).

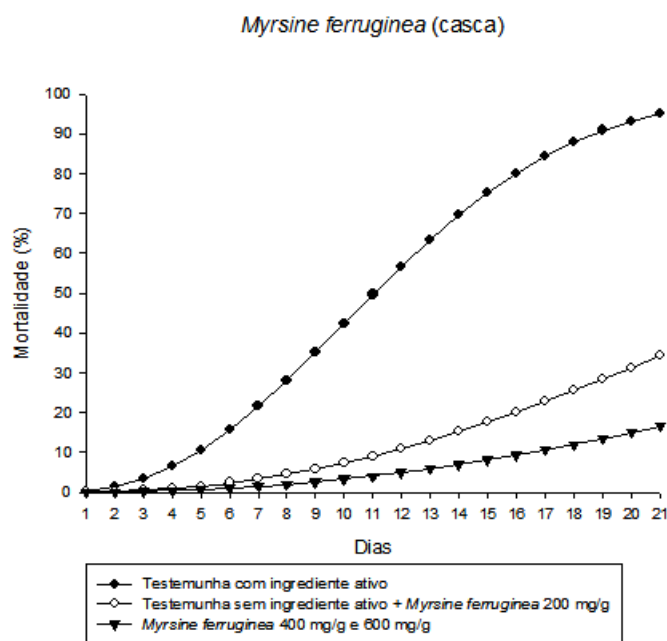


Figura 9 Toxicidade do extrato vegetal de *Myrsine ferruginea* (casca) (Myrsinaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens*

(Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A curva de mortalidade de todas as concentrações testadas (200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica) do extrato vegetal de folhas de *S. guianensis* foram semelhantes a testemunha sem ingrediente ativo. A mortalidade nas primeiras 24 horas foi de 0,55% e de 50,51% aos 21 dias de avaliação e TL<sub>50</sub> igual a 21 dias. A testemunha com ingrediente ativo neste tratamento variou entre 1,76% s 24 horas e 89,52% após 21 dias (Tabela 1, Figura 10).

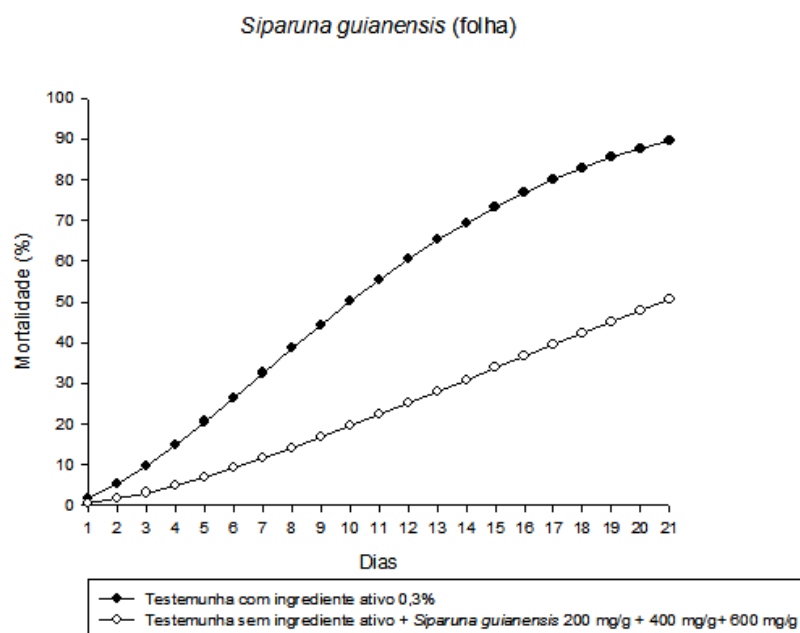


Figura 10 Toxicidade do extrato vegetal de *Siparuna guianensis* (folha) (Siparunaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

#### 4 DISCUSSÃO

Dentre os extratos vegetais avaliados *Croton floribundus* (casca e folha), *C. urucurana* (folha), *E. handroana* (folha), *E. falcata* (casca), *G. concolor* (folha), *T. catigua* (casca) e *Z. pohlium* (folha) apresentaram ação formicida.

Nos bioensaios realizados com folha e casca de *C. floribundus* e folha de *C. urucurana* foi possível observar reações de alarme por parte das operárias, como abertura das mandíbulas e elevação das antenas. Observaram-se várias formigas mutiladas, embora as mesmas não tenham sido quantificadas. Isto sugere uma resposta comportamental das formigas quando expostas a estes dois extratos vegetais. Observações semelhantes foram constatadas por Marinho et al. (2006) em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* expostas a *â-eudesmol*, extraído de *Eucalyptus maculata* (Myrtaceae) e sugeriu ausência de reconhecimento das companheiras de ninho ou interferência neste processo. Compostos presentes em outras espécies da família Euphorbiaceae, como a ricinina encontrada em *Ricinus communis*, apresentaram elevada toxicidade a operárias de *Atta sexdens* (BIGI et al., 2004). Atividade inseticida não havia sido relatada com extratos de *C. floribundus*. Apenas atividades moluscicida e cercaricida do extrato vegetal de casca e do seu composto isolado, ácido caurenóico (MEDINA et al., 2009).

*Erythrina falcata* (casca) apresentou elevado potencial formicida. A atividade inseticida desta planta ainda não havia sido relatada na literatura, porém foi constatado seu efeito contraceptivo (com distúrbios na pré-implantação do embrião) em ratos (ORIHUELA; ISHIYAMA, 2006). Em outras espécies de *Erythrina* constatou-se efeito analgésico em ratos (FISCHER et al., 1990); e antibactericida sobre *Bacillus brevis* (REDKO et al., 2007). Um dos poucos estudos relatando a atividade inseticida deste gênero foi realizado com a

espécie *Erythrina variegata*, a qual apresentou atividade de deterrência alimentar em *Sitophilus zeamais* (LIU et al., 2012). Desta planta foram isolados dois alcaloide, identificados como as erysopine e erysovine a partir dos seus dados espectroscópicos. Erisopina e erisovina possuem atividade anti-alimentar contra adultos de *S. zeamais* com valores de concentração eficaz ( $EC_{50}$ ) de 108,5 e 89,7 ppm, respectivamente (LIU et al., 2012).

O extrato vegetal proveniente de *Trichilia catigua* (casca) também foi efetivo na mortalidade de *A. s. rubropilosa*. Extratos pertencentes a família Meliaceae já haviam sido testado sem *Acromyrmex lundii*, sendo os extratos cetônicos de *Trichilia glauca* os mais tóxicos e menos repelentes (CAFFARINI et al., 2008). A toxicidade de *Trichilia* spp. já havia sido relatada para outros insetos, tais como *Spodoptera frugiperda* (BOGORNI; VENDRAMIN, 2005; MATOS et al., 2009; NEBO et al., 2010), *Tuta absoluta* (CUNHA et al., 2005), *Diabrotica speciosa* (SEFFRIN et al., 2008) e *Bemisia tabaci* (BEZERRA-SILVA et al., 2012). Dos extratos metanólicos dos frutos de *T. elegans* foram isoladas as cumarinas (escoporona, escopoletina, umbeliferona) e o limonoide (11â-acetoxiobacunona), do extrato hexânico foram isoladas as mesmas cumarinas e os esteroides (â-sitosterol, estigmasterol, campesterol e sitostenona) estas substâncias apresentaram atividade inseticida contra *S. frugiperda* (MATOS et al., 2009). *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* são também meliáceas e foram tóxicas contra *Atta sexdens* e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. Dos frutos de *C. fruticosa* isolou-se os limonoides cipadesina B e swietemahonolideo e das raízes de *C. fissilis* isolou-se o limonoide 3â-acetoxicarapina e os triterpenos ácido oleanólico e ácido oleanônico (LEITE et al., 2005).

Algumas espécies das plantas testadas neste trabalho ainda não foram relatadas na literatura com atividade formicida, como *Z. pohlianum*. Óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de *Zanthoxylum* exibiram importante

atividade fungicida (*Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*) e inseticida (*Sitophilus zeamais*) (WANG et al., 2011). Os compostos estragole, linalool e sabinene isolados de folhas e frutos de *Z. schinifolium* apresentaram forte efeito fumigante contra *S. zeamais* (WANG et al., 2011). Anteriormente já havia sido relatada a atividade de deterrência alimentar desta planta contra *S. zeamais* e *Tribolium castaneum*. A partir de extratos metanólicos isolaram-se dois compostos, schinifoline e skimianine, responsáveis por esta atividade (LIU; CHU; JIANG, 2009). Outras rutáceas, tais como *Helietta puberulla* (ácido antranílico, kokusaginine e dictamina) (ALMEIDA et al., 2007) e *Raulinoa echinata* (ácido limonéxico) também apresentaram atividade formicida em operárias de *Atta sexdens* (BIAVATTI et al., 2005). Óleos essenciais de folhas de *E. uniflora* apresentaram atividade contra bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e duas espécies de fungo (*Candida lipolytica* e *Candida guilliermondii*) (VICTORIA et al., 2012).

A variação de respostas observadas nas concentrações dos extratos vegetais oferecidos via ingestão s formigas cortadeiras podem estar relacionadas taxa de consumo, pois este parâmetro não foi mensurado no experimento. As concentrações mais elevadas podem ter sido menos atrativas por causa do odor, cor ou gosto do extrato vegetal. Em alguns experimentos, pode ser observado quando as operárias se aproximavam da pasta oferecida, as tocavam com as antenas e pernas dianteiras, lambiam e se afastavam. Além disso, verificou-se o comportamento de cobrir a pasta oferecida com fragmentos de papel alumínio como resposta a repulsão ao extrato vegetal.

A mortalidade natural das formigas cortadeiras isoladas das colônias foi semelhante aquelas encontradas por Silva et al. (2003) quando tais insetos foram submetidos a fontes alimentares ricas em glicose. Biavatti et al. (2005) verificaram variação da mortalidade natural entre 60 e 80% depois de 21 dias de

avaliação quando avaliaram as substâncias ativas epoxi-fraxinelona e ácido limonéxico, respectivamente.

As formigas cortadeiras quando submetidas sulfluramida apresentam sintomas característicos de intoxicação incluindo movimento lento e paralisia das pernas traseiras e distendimento das mesmas, fato já relatado por Nagamoto et al. (2004). Além disso, sintoma de diarréia foi observado nestes insetos. As sulfluramidas testadas por Vander-Meer et al. (1985) (GX071) e Nagamoto et al. (2004) (GX071HB e GX439) contra *Solenopsis invicta* e *Atta sexdens*, respectivamente, apresentaram um padrão de comportamento, ou seja, mortalidade menor que 15% em 24 horas e maior que 90% após 21 dias de avaliação, em uma ou mais concentrações testadas, fato também constatado nestes experimentos. Assim foi possível propor que a ação retardada é a principal explicação para a alta eficiência no controle de todas as espécies de formigas cortadeiras. O inseticida possuindo efeito retardado possibilita o carregamento da isca pelas forrageadoras para o interior da colônia, por isso a importância de novos formicidas com essa característica.

## 5 CONCLUSÃO

Os extratos vegetais de *C. floribundus*, *C. urucurana*, *E. falcata*, *E. handroana*, *G. concolor*, *T. catigua* e *Z. pohlianum* apresentaram potencial no controle de formigas cortadeiras *Atta sexdens* em testes *in vitro* de ingestão e devem ser melhor investigados visando o seu uso na confecção de iscas comerciais.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N.A. et al. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2007.
- BEZERRA-SILVA, G.C.D. et al. Insecticidal and Behavioral effects of secondary metabolites from Meliaceae on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, n. 3, p. 743-751, 2012.
- BIAVATTI, M.W. et al. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata* x-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, 2005.
- BICALHO, K.U. et al. Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche: a Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- BIGI, M.F.M.A. et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.
- BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 311-317, 2005.
- 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**, Jaboticabal, v. 26, n.1, p.107-113, 1997.
- CAFFARINI, P. et al. Efectos de extractos acetonicos y acuosos de *Ricinus communis* (Ricino), *Melia azedarach* (Paraiso) y *Trichillia glauca* (Trichillia), sobre la hormiga negra comum (*Acromyrmex lundii*). **Idesia**, Arica, v. 26, n. 1, p. 59-64, 2008.

CUNHA, U. S. da et al. Potencial de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) como fonte de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 667-673, 2005.

DELABIE, J.H.C. et al. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p. 80-101.

DELLA LUCIA, T.M.C.; MARINHO, C.G.S.; RIBEIRO, M.M.R. Perspectivas no manejo de formigas cortadeiras. In: VILELA, E.F. et al. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2008. p. 369-380.

FISCHER, L.G.O. et al. Analgesic properties of extracts and fractions from *Erythrina crista-gali* (Fabaceae) leaves. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 21, n. 8, p. 759-766, 1990.

FORTI, L.C.; BOARETTO, M.A.C. **Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle**. Botucatu:UNESP, 1997.61p.

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

LEITE, A.C. et al. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1391-1395, 2005.

LIU, Z.L.; CHU, S.S.; JIANG, G.H. Feeding deterrents from *Zanthoxylum schinifolium* against two stored-products insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 21, p. 10130-10133, Nov. 2009.

LIU, Z.L. et al. Antifeedants from Chinese medicinal herb, *Erythrina variegata* var. *orientalis*, against maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 2, p. 171-172, 2012.

MARINHO, C.G.S. et al. Aggressive response of pest ant species to  $\beta$ -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 445-454, 2006.

MARSARO JUNIOR, A.L. et al. Behavioral changes in workers of leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 30, n. 9, p. 1753-1762, Sept. 2004.

MATOS, A.P. et al. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1553-1556, nov./dez. 2009.

MEDINA, J.M. et al. Evaluation of the molluscicidal and *Shistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1B, p. 207-211, 2009.

MORINI, M.S.C. et al. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

NAGAMOTO, N.S. et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 413-431, 2004.

NEBO, L. et al. Atividade inseticida dos frutos de *Trichilia clausenii* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1849-1852, set. 2010.

ORIHUELA, P.A.; ISHIYAMA, V. Postcoital ingestion of the aqueous extract of *Erythrina falcata* Benth prevents pregnancy in the mouse. **Contraception**, Stoneham, v. 73, n. 3, p. 307-310, 2006.

PEÑAFLORES, M.F.G.V. et al. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing, reference index version 2.2.1. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2005. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 jan. 2010.

REDKO, F. et al. Antimicrobial isoflavonoids from *Erythrina crista galli* infected with *Phomopsis* sp. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, Balgalore, v. 62, n. 3/4, p. 164-168, 2007.

SEFFRIN, R.C. A. dos S. et al. Comportamento alimentar de adultos de *Diabrotica speciosa* na presença de extratos aquosos de Meliaceae. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2115-2118, dez. 2008.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, Apr. 2003.

SILVA-PINHATI, A.C.O. et al. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

THERNEAU, T. **Survival**: survival analysis, including penalised likelihood. R Package Version 2.35-8. Disponível em: <<http://r-forge.r-project.org>>. Acesso em: 15 out. 2011.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **9 new POPs**. Stockholm, 2010. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Implementation/NewPOPs/Publications/tabid/695/Default.aspx>>. Acesso em: 5 jul. 2011.

\_\_\_\_\_. **Persistent organic pollutants review committee**: risk management evaluation on perfluorooctane sulfonate. Stockholm, 2007. Disponível em: <[http://chm.pops.int/Portals/0/docs/from\\_old\\_website/documents/meetings/poprc/chem\\_review/PFOS/PFOS\\_RME\\_e.pdf](http://chm.pops.int/Portals/0/docs/from_old_website/documents/meetings/poprc/chem_review/PFOS/PFOS_RME_e.pdf)>. Acesso em: 7 nov. 2011.

VANDER-MEER, R.K.; LOFGREN, C.S.; WILLIAMS, D.F. Fluoroaliphatic sulfones: a new class of delayed-action insecticides for control of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 78, n. 6, p. 1190-1197, 1985.

VICTORIA, F.N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

VIEIRA, A.S.; BUENO, O.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. The functional morphology of the metapleural gland of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Micron**, New York, v. 41, n. 2, p. 149-157, 2010.

WANG, C.F. et al. Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits leaves. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 4, p. 3077-3088, Apr. 2011.

**CAPÍTULO 3 Avaliação da toxicidade das frações e composto isolado de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) sobre *Atta sexdens rubropilosa* Linnaeus (Formicidae)**

**RESUMO**

Avaliou-se em condições de laboratório a toxicidade das frações de *Croton floribundus*, oferecidos via ingestão às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Foram testadas as frações hexânica, acetato de etila, metanólica, e o resíduo das frações hexânica e acetato de etila, além das fases: aquosa e orgânica, e resíduo destas fases de *C. floribundus*. Utilizaram-se 2 testemunhas, uma sem e outra com ingrediente ativo sulfluramida (0,3%). Para cada tratamento utilizaram-se 6 repetições em placas de Petri, contendo 20 formigas. As frações, as fases e resíduo foram dissolvidos em metanol e adicionados polpa cítrica nesta solução, com remoção do solvente através do rotoevaporador. Antes da aplicação, as formulações foram finalizadas com a adição de solução de sacarose 10%. Em cada tratamento foi feita a adição de 2 g da formulação por placa. As mesmas foram removidas depois de 24 horas e adicionou-se dieta artificial. A mortalidade das formigas foi avaliada no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> após a aplicação. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. A fração acetato de etila, fração metanólica e a fase aquosa da fração metanólica de *C. floribundus* apresentaram atividade formicida. A fração acetato de etila exibiu 64% de mortalidade aos 21 dias de avaliação, em duas concentrações testadas (400 e 600 mg/g) e TL<sub>50</sub> de 17,5 dias. A fração metanólica causou 80,54% de mortalidade aos 21 dias de avaliação, em duas concentrações avaliadas (200 e 600 mg/g) e teve TL<sub>50</sub> de 11 dias. Já na fase aquosa, o comportamento da curva de mortalidade nas maiores concentrações foi semelhante à mortalidade da testemunha com sulfluramida 0,3% (87,69% após 21 dias, com TL<sub>50</sub>=7,9 dias). Da fração acetato isolou-se o ácido caurenóico, porém este não apresentou atividade formicida.

Palavras-chave: Formigas cortadeiras. Extrato botânico. Controle de insetos. Manejo integrado de pragas florestais.

## ABSTRACT

The toxicity of *Croton floribundus* plant extract to worker ants (*Atta sexdens rubropilosa*) offered by ingestion was assessed under laboratory conditions. It was tested the fractions of hexane, ethyl acetate, methanol, as well as the residue fractions of hexane and ethyl acetate, apart from the aqueous and organic phases and its residues of *C. floribundus*. We used two controls: two controls: with or without sulfluramid (0.3%). For each treatment there were six replications for Petri dishes containing 20 ants. We evaluated three concentrations of crude extract (200, 400, and 600 mg/g of citrus pulp). Proportional calculations were made for fractions and phases assessed, multiplying mass concentrations by 1.2 (correction factor). Fractions, phases, and residue were dissolved in methanol and citrus pulp was added in this solution, removing the solvent by rotary evaporator. Before application, it was added saccharose 10% in the solution. In each treatment 2 g of formulation were added per Petri dish. Petri dishes were removed after 24 hours and artificial diet was applied. Mortality of ants were evaluated at 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup>, and 21<sup>o</sup> days after application. Data regarding mortality were analyzed using the Weibull distribution. The fractions of ethyl acetate, methanol, and aqueous fraction of methanol of *C. floribundus* showed formicide activity. Ethyl acetate fraction exhibited 64% of mortality after 21 days of assessment at two concentrations tested (400 and 600 mg/g) and LT<sub>50</sub> of 17.5 days. The methanolic fraction, caused 80.54% of mortality after 21 days of assessment, at two concentrations (200 and 600 mg/g) and LT<sub>50</sub> of 11 days. In the aqueous phase, the behavior of mortality curve at the highest concentrations was similar to the control mortality with sulfluramid 0.3% (87.69% after 21 days, LT<sub>50</sub> = 7.9 days). From acetate fraction, kaurenoic acid was isolated, however without formicide activity.

Keywords: Leafcutter ants. Botanical extract. Pest control. Integrated management of forest pests.

## 1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (*Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr) são as principais pragas de reflorestamento no Brasil (ANJOS; MOREIRA; DELLA LUCIA, 1993), pois atacam as plantas em qualquer fase de seu desenvolvimento, promovendo a desfolha, uma vez que o fungo simbiote necessita de altas quantidades de fragmentos vegetais para a sua sobrevivência. Essa desfolha resulta em perdas diretas (morte de mudas e a redução do crescimento de árvores) e indiretas (diminuição da resistência das árvores a outros insetos e a agentes patogênicos) (ZANETTI, 2007).

Há algum tempo, o controle das formigas cortadeiras tem sido realizado, quase exclusivamente, com a aplicação de inseticidas convencionais, entre eles, cyfluthrin (piretróide), imidacloprid (neonicotinóide), furathiocarb (carbamato), fipronil (fenilpirazol) e sulfluramida (sulfonamida fluoroalifática) (BRASIL, 2010). As estratégias de controle químico diferem principalmente em função do tipo de formulação, que pode ser na forma de pó, líquido ou granulado. Dentre as formulações disponíveis, destacam-se as iscas granuladas devido a vantagem de representar menos perigo para os trabalhadores que utilizam os inseticidas. Ademais, elas permitem que os ninhos sejam tratados em locais de difícil acesso e sem necessidade de equipamentos para esse fim. Dentre os inseticidas comumente empregados em iscas formicidas incluem sulfluramida, clorpirifós, e uma mistura de sulfluramida e fipronil. A sulfluramida foi introduzida no mercado brasileiro pela primeira vez em 1993 para substituir o mirex organoclorado (= dechlorane), que havia sido proibido devido a sua alta toxicidade e persistência no meio ambiente (ISENRING; NEUMEISTER, 2011).

A sulfluramida permite o controle de formigas cortadeiras de forma eficaz, chegando a causar 100% de mortalidade destes insetos. A sulfluramida é um inseticida de ação lenta, que afeta o processo de fosforilação oxidativa (respiração aeróbia) agindo sobre as mitocôndrias, interrompendo a produção de ATP (adenosina trifosfato), o que é letal para insetos. Um dos grandes problemas em sua utilização em campo é a sua persistência extremamente alta. Nos termos da Convenção de Estocolmo, o sulfonato de perfluorooctano (principal precursor da sulfluramida) será restrito, ou pode, eventualmente, ser proibido (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME- UNEP, 2007).

Florestas certificadas pelo FSC (Forest Stewardship Council) no Brasil derrogaram o uso de inseticidas considerados altamente perigosos (*highly hazardous*), incluindo deltametrina, fipronil, fenitrotiom, e sulfluramida para o controle de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Isto significa que até 2014 o uso da sulfluramida deverá ser interrompido em tais plantações. Para tanto, os órgãos certificadores aconselham a redução gradual da quantidade de sulfluramida comumente utilizada e ainda a substituição por outros inseticidas e/ou formas de controle (ISENRING; NEUMEISTER, 2011).

Assim, a descoberta de novas substâncias que sejam menos tóxicas ao meio ambiente para o controle de formigas cortadeiras constitui um importante objeto de estudo em benefício da produção florestal nacional. Nessa linha de pesquisa, novas moléculas químicas extraídas de plantas têm sido estudadas visando a substituição da sulfluramida como principal ingrediente ativo nas iscas formicidas. Dentre essas substâncias têm-se a sesamina e sesamolin (Pedaliaceae; *Sesamum indicum* L.) (MORINI et al., 2005); astilbin (Fabaceae; *Dimorphandra mollis* Benth.) (CINTRA et al., 2005); ácido limonéxico (Rutaceae; *Raulinoa echinata* R.S.Cowan) (BIAVATTI et al., 2005); cocusagina, ácido antranílico e dictamnina (Rutaceae; *Helietta puberula* RE Fr.) (ALMEIDA et al., 2007);



elemol e  $\beta$ -eudesmol (Myrtaceae; *Corymbia maculata* (syn. *Eucalyptus maculata*)(Hook.) K.D. Hill e L.A.S. Johnson;  $6\alpha$ -acetoxigedunin (Meliaceae; *Carapa guianensis*Aubl.) (AMBROZIN et al., 2006); furoquinolinas, ariquinolin-4-ona, ácido limonéxico, limonin (Rutaceae; *Spiranthera odoratissima* St. Hil) (TEREZAN et al., 2010). Também vale mencionar que o ácido palmítico, presente na fração metanólica de extratos hexânicos de folhas de *Ricinus communis* L. inibiu o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* (81%), que é de vital importância para a sobrevivência de uma colônia de formigas cortadeiras. Além disso, a ricinina, obtida da fração metanólica do extrato em diclorometano da mesma planta, reduziu a sobrevivência média das operárias de *A. sexdens* ( $S_{50}=5,21$  dias; 0,40 mg/mL) se comparado ao controle ( $S_{50}=10,82$  dias) quando oferecido via ingestão (BIGI et al., 2004).

Em decorrência da descoberta de novas plantas o potencial das plantas para a produção de substâncias ativas contra formigas cortadeiras (capítulo2), e da demanda por novas substâncias para uso no controle deste inseto. Este estudo teve por objetivo confirmar a atividade das frações do extrato vegetal de *Croton floribundus* e identificar as substâncias presentes neste extrato que seriam responsáveis pela toxicidade.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material botânico e preparo do extrato bruto

O material vegetal de cascas de *Croton floribundus*, Família Euphorbiaceae foi coletado no Viveiro Florestal da UFLA/Lavras, Minas Gerais (04/2011). Esta planta foi identificada e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Esal/UFLA com o número de registro 26941.

O material vegetal de *C. floribundus* foi seco em estufa de ventilação forçada, a 40 °C, durante 48 horas, moído e armazenado em freezer (aproximadamente -14 °C) até a realização das extrações. Para a extração utilizaram-se 1322 g de peso seco de casca de *C. floribundus*. O material vegetal de cada planta foi dividido em partes de 50 g, e foram colocadas em frascos de vidro (475 mL), aos quais adicionou-se metanol (150 mL). Depois do extrato ter sido submetido a maceração em metanol por 24 horas, o mesmo passou por um processo de filtração, utilizando-se algodão hidrófilo. Este procedimento foi realizado por mais sete vezes para a extração do máximo possível de substâncias dos tecidos vegetais. Para as filtrações se utilizou um frasco de kitassato acoplado a um sistema de vácuo através de mangueira. O solvente da solução final foi removido em evaporador rotatório. A seguir, para a total remoção da umidade, os resíduos obtidos foram totalmente secos por liofilização durante um período de 24 horas, obtendo-se assim o extrato bruto metanólico (Embiú), na forma de um sólido granuloso, coloração vinho, com massa de 290 g (21,94% de rendimento, com relação a massa seca empregada). Todas as etapas de extração da planta *C. floribundus* foi realizada em parceria com o laboratório de Química da UFLA.

## **2.2 Fracionamento das frações do extrato bruto metanólico solúveis em hexano, acetato de etila e metanol**

Adicionou-se 900 mL de hexano a uma parte (240,04 g) do EBMeOH, de *C. floribundus*, obtido conforme descrito no item 2.1. A mistura resultante foi agitada por 20 minutos e, após repouso por 10 minutos, filtrou-se a referida mistura em algodão hidrófilo. O resíduo de tal filtração foi submetido ao mesmo processo mais oito vezes. As fases solúveis em hexano foram combinadas e filtradas, pois se formou um precipitado na mesma. A seguir, a solução resultante foi concentrada em evaporador e liofilizadora para resultar na obtenção de um sólido pastoso de cor caramelo, com massa de 23,91g (código G-09-1, rendimento 9,96% em relação a massa do EBMeOH). O material precipitado também foi submetido a remoção do solvente em evaporador rotatório para resultar em um pó de coloração rosa, com massa de 6,47g (código G-09-2, rendimento 2,69% em relação a massa do EBMeOH). O resíduo insolúvel em hexano foi submetido ao mesmo processo de extração, empregando-se acetato de etila no lugar do hexano e o processo de lavagem com este solvente foi realizado por seis vezes. Também se observou a formação de um precipitado na fase líquida, que foi separado por filtração e submetido a remoção do solvente em evaporador rotatório e liofilizadora para resultar em 15,96g de um sólido pastoso cor marrom esverdeada (código G-09-3, rendimento 6,64% em relação a massa do EBMeOH inicial). Após remoção do solvente da fase solúvel em acetato de etila se obteve um resíduo (pó) de coloração rosa claro, com massa de 2,55g (código G-09-4, rendimento 1,06% em relação a massa de extrato bruto metanólico inicial). O resíduo insolúvel em acetato de etila foi submetido a processo similar, empregando-se metanol no

lugar de acetato de etila. O processo de lavagem com este solvente foi realizado por nove vezes. Com isto, obteve-se um resíduo final (solúvel em metanol) de um sólido em pó, coloração vinho, com massa de 166,60 g (código G-09-5, rendimento 69,40% em relação a massa do EBMeOH). Todas as frações obtidas foram armazenadas em freezer a -15 °C até o momento de serem utilizadas.

### **2.3 Partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato bruto metanólico de *Croton floribundus***

A fração metanólica (FMeOH) de *Croton floribundus* (8 g) foi solubilizada em diclorometano (60 mL), e a solução resultante foi transferida para um funil de decantação (500 mL), ao qual se adicionou água destilada (180 mL). Este foi agitado vigorosamente por 20 minutos e, após 10 minutos em repouso, removeu-se a fase inferior (diclorometano) e adicionou-se mais 60 mL de diclorometano ao funil para que o processo fosse repetido. Todo o procedimento de partição foi repetido até que a cor da fração inferior ficasse estabilizada (bem clara). Após cinco etapas de partição, as fases coletadas (diclorometano) foram centrifugadas para separá-las de uma fase intermediária, com o aspecto de uma “gosma”, que se formou durante o processo de partição. Em seguida, combinaram-se as fases de diclorometano e se removeu o solvente em evaporador rotatório e liofilizadora para a obtenção de um sólido em pó de coloração vinho, com massa de 0,82 g (G-20-2, rendimento de 10,25% em relação a FMeOH). A fase intermediária e a fase superior (aquosa) também foram submetidas a processo de concentração em evaporador rotatório e liofilizadora para resultarem na obtenção de um sólido em pó de coloração rosa, com massa de 1,39g (G-20-3, com rendimento de 17,37% em relação a FMeOH) e de um sólido cristalino de coloração marrom avermelhado, com massa de 4,90 g (G-20-1, rendimento de 61,25% em relação a FMeOH), respectivamente.

#### **2.4 Fracionamento por cromatografia em coluna da fração solúvel em acetato de etila (FACoEt) do extrato bruto metanólico (EBMeOH)**

Todas as etapas de fracionamento das amostras da fração acetato foram realizadas no laboratório de Química da UFLA, em parceria com Gajo et al., 2013.

A fração solúvel em acetato de etila (4,9 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (7 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando-se os gradientes de Hexano/Acetato (9:1, 2L; 8:2, 1L; 1:1, 1L; 0:100 1L) e Metanol 100% 1L. Coletaram-se 64 frações (G-38-1 a G-38-64) de 100 mL, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se placas de alumínio recobertas com sílica gel 60F<sub>254</sub>. Para revelar as substâncias foi empregada luz ultravioleta (254 nm), vapor de iodo e solução ácido fosfomolibdico a 5% (g.mL<sup>-1</sup>) em etanol. As frações apresentando o mesmo perfil cromatográfico foram combinadas, originando nove novas frações (G-38-01 a G-38-09). Dentre elas a fração 02 (G-38-02) e 03 (G-38-03) foram combinadas (massa=2,09 g), e submeteu-se a novo fracionamento por ainda se apresentar impura e com massa suficiente para dar continuidade ao trabalho.

#### **2.5 Fracionamento das amostras G-38-02 e G-38-03 proveniente da FACoEt**

Parte da massa total obtida (600 mg) das frações G-38-02 e G-38-03 foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (4 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando-se uma combinação isocrática de

Hexano/Acetato (9:1, 800 mL). As frações coletadas (24 frações de 30 mL) foram também analisadas por CCD e combinadas de acordo com a similaridade cromatográfica, originando três novas sub-frações (G-79-01 a G-79-03).

## 2.6 Fracionamento da amostra G-79-02 proveniente da FAcOet

A fração G-79-02 (384 mg) foi submetida a novo fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (4 x 15 cm) (STILL; KAHN; MITRA, 1978), utilizando-se o gradiente de solventes Hexano/Acetato (20:1, 600 mL; 9:1, 600mL). As frações coletadas (43 frações, de 30 mL) foram também analisadas por CCD e combinadas de acordo com a similaridade cromatográfica, originando seis novas sub-frações (G-82-01 a G-82-06) dentre as quais a G-82-02 (4,4 mg), G-82-04 (318,2 mg) e G-82-06 (1,2 mg) se apresentaram cromatograficamente puras.

## 2.7 Identificação das substâncias purificadas

As análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono treze ( $^{13}\text{C}$ ) foram realizadas em um equipamento Bruker Avance DRX-400 (400 MHz), no Laboratório de Ressonância Magnética Multi-Usuário (Laremar), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICEx), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Obtiveram-se espectros unidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135) e bidimensionais (NOESY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY, COSY) das amostras dissolvidas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ , Sigma-Aldrich) contendo tetrametilsilano (TMS), que foi utilizado como referência interna.

A identificação da substância ativa foi realizada por Gajo et al., 2013.

## **2.8 Experimentos com formigas realizados em condições de laboratório**

Os testes foram executados segundo a metodologia adaptada de Nagamoto et al. (2004). No laboratório de Manejo Integrado Florestal da UFLA existem seis ninhos adultos já estabelecidos, os quais são mantidos em sala climatizada, com temperatura de  $21 \pm 2$  °C, 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de  $70\% \pm 5$ . Nos bioensaios de toxicidade *in vitro* de ingestão, utilizaram-se operárias de *Atta sexdens rubropilosa* retiradas dos mesmos ninhos adultos, sendo estes ninhos adultos revezados em cada bioensaio.

Nos experimentos foram utilizadas operárias de tamanho médio, cujas massas variaram entre 10 e 20 mg, e cápsulas cefálicas entre 2,0 e 2,8 mm. Utilizou-se 10 exemplares de formigas cortadeiras, as quais a cápsula cefálica foi medida com auxílio de um microscópio óptico e as mesmas foram pesadas e guardadas em frascos de vidro. Estas foram utilizadas como base para a coleta de novas operárias.

Nestes experimentos se avaliou as frações solúveis em hexano (G-09-1), acetato de etila (G-09-3) e metanol (G-09-5) dos extratos brutos metanólicos de *C. floribundus*. Também se avaliaram os precipitados das frações solúveis em acetato de etila (G-09-4) e hexano (G-09-2), bem como as frações obtidas durante o processo de partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato da mencionada planta: fase aquosa (G-20-1), orgânica (G-20-2) e a fase intermediária obtida durante a partição (G-20-3). Empregaram-se duas testemunhas: uma sem ingrediente ativo e a outra com o ingrediente ativo sulfluramida (sulfluramida técnica a 93%). Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, sendo cada uma composta por 20 formigas por placa de Petri de 10 cm de diâmetro, forrada com papel-filtro.

Para a condução do experimento se utilizou bagaço de laranja (polpa cítrica), o qual foi desidratado em estufa por três dias a 40 °C e, em seguida, foi triturado em liquidificador por várias vezes e passado em uma malha fina (0,50 mm) até apresentar o aspecto visual de pó homogêneo.

As frações e as fases foram dissolvidas em metanol (+/-30 mL), resultando em uma suspensão, a qual foi adicionado o pó da polpa cítrica (1 g). No caso do ingrediente ativo se utilizaram 16 mL de acetona no lugar do metanol. As misturas resultantes foram homogeneizadas com frequente agitação manual (10 minutos) e ultrassom (5 minutos, potência 1400 A). A seguir, o solvente foi removido de cada mistura em evaporador rotatório e, imediatamente antes do início do experimento, adicionou-se uma solução de sacarose a 10% (g/mL) até que fosse obtida uma pasta homogênea ( $\pm$  20 mL).

Utilizaram-se três concentrações para cada uma das amostras. Utilizou-se como referência para os cálculos, as massas do extrato bruto de *C. floribundus* (200, 400 e 600 mg), o qual já foi relatado atividade formicida, conforme capítulo 1. Quanto as frações, a massa utilizada em cada experimento (MFR) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $MFR = ((CEB*6)*MF)/MTEB*1,2$ ; onde CEB é a concentração do Extrato Bruto; MF é a massa da fração e MTEB é a massa total do extrato bruto. Com relação as massa utilizadas nas fases (MFA), estas foram calculadas da seguinte fórmula  $MFA = [(((CEB*6)*MF_{MeOH})/MTEB*1,2)*MF_{fase}] / MTF_{MeOH}$ , onde CEB é a concentração do Extrato Bruto. As concentrações de cada uma das amostras na dieta final são apresentadas na tabela 1. Para testar a substância isolada, utilizou-se cálculo proporcional de massa da substância isolada dentro de cada etapa do fracionamento, de acordo com as seguintes fórmulas:  $((MTF (G-38-02 e G-38-03) *MSI/MPFC (G-38-02 e G-38-03)) *MTFA/MTUC) *0,191/MTFA) *FC$ , onde MTF é a massa total da fração (G-38-02 e G-38-03) (=2,09), MSI é a massa da substância isolada (318,2 mg), MPFC é a Massa parcial da fração



utilizada na coluna (600 mg), MTFA é a massa da fração acetato (15,96 g), MTUC é a massa total da fração utilizada na primeira coluna (4,9 g); 0,191 é ao valor correspondente da concentração de 400 mg da fração acetato, a qual foi efetiva contra formigas cortadeiras e FC é o fator de correção utilizado (2,32).

Tabela 1 Massa das Frações e Fases obtidas a partir do extrato bruto metanólico de *Croton foribundus*, rendimento das frações ou fase em relação ao total do extrato bruto e massa total utilizada para avaliar a atividade formicida contra *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em testes via ingestão

Tratamentos	Massa da Fração (MF) (g)	Massa das Fases	Rendimento da Fração ou Fase em relação ao MTEB ou MTFMeOH (%)	Concentração do Extrato Bruto (CEB) (mg/g)	Massa total utilizada (g)
Fração Hexano (FH)	23,9192	-	9,96	200	0,1435
				400	0,2870
				600	0,4305
Resíduo da F. Hex. (RFH)	6,4792	-	2,69	200	0,0388
				400	0,0777
				600	0,0971
Fração Acetato (FA)	15,9665	-	6,65	200	0,0957
				400	0,1915
				600	0,2873
Resíduo da FAcOet (RFAcOet)	2,5532	-	1,06	200	0,0153
				400	0,0306
				600	0,0459
Fração Metanólica (MFMeOH)	166,6005	-	69,41	200	0,9996
				400	1,9992
				600	2,9988
Fase Aquosa (FAq)	-	4,9018	61,27	200	0,6124
				400	1,2249
				600	1,8374

“Tabela 1, conclusão”

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa da Fração (MF) (g)</b>	<b>Massa das Fases</b>	<b>Rendimento da Fração ou Fase em relação ao MTEB ou MTFMeOH (%)</b>	<b>Concentração do Extrato Bruto (CEB) (mg/g)</b>	<b>Massa total utilizada (g)</b>
Fase Orgânica (FOr)	-	0,8263	10,32	200	0,1028
				400	0,2057
				600	0,3097
Resíduo	-	1,3902	17,37	200	0,1737
				400	0,3474
				600	0,5211

\*Massa total do Extrato Bruto (MTEB) = 240 g; \*\*Massa total da FMeOH (MTFMeOH) = 8g.

Cada uma das dietas preparadas conforme descrito acima foram colocadas em placas de Petri (2,0 g) e oferecidas as formigas por um período de 24 horas. Após esse período tais dietas foram trocadas por dieta artificial, composta de glicose, bacto-peptona, extrato de levedura, ágar e água destilada (100 mL) (BUENO et al., 1997). Após a adição da água, a dieta artificial foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos e ao final, foram vertidas em placas de Petri. Pedacos de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  desta dieta foram oferecidos as formigas durante todo o período de avaliação.

A mortalidade foi avaliada nas operárias de tamanho médio no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias após o oferecimento das dietas impregnadas com as frações e fases de *C. floribundus*. Todos os experimentos foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de  $21 \pm 2 \text{ °C}$ , 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de  $70\% \pm 5$ . Os dados foram submetidos a análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Realizou-se ainda o teste de contraste para verificar semelhança entre os tratamentos, criando-se grupos de efeitos semelhantes ( $\chi^2$ ;  $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005) e do pacote estatístico Survival (THERNEAU, 2011).

### 3 RESULTADOS

As frações acetato de etila, a fração metanólica e a fase aquosa da fração metanólica de *C. floribundus* apresentaram atividade formicida (Tabela 2). A fração acetato apresentou quatro curvas distintas de mortalidade (Figura 1). A primeira curva é representada pelo tratamento testemunha com ingrediente ativo sulfluramida 0,3%, o qual foi observado maior mortalidade ao longo do tempo, 0,21% em 24 horas e 82,18% após 21 dias de avaliação,  $TL_{50}=13$  dias. A segunda curva de maior mortalidade é representada pelas concentrações de 400 e 600  $mg.g^{-1}$ , e estas formaram grupos congêneres, apresentando mortalidade de 0,12% em 24 horas e 64,72% após 21 dias,  $TL_{50}=17,5$  dias. A terceira e quarta curvas de mortalidade são representadas pela concentração de 200  $mg.g^{-1}$  e pela testemunha sem ingrediente ativo onde apresentaram baixa mortalidade após 21 dias de avaliação, de 51,80% ( $TL_{50}=20,6$  dias) e 38,26% ( $TL_{50}>21$  dias), respectivamente (Tabela 2, Figura 1).

Tabela 2 Concentração da pasta oferecida, Tempo letal mediano (TL<sub>50</sub>) \*, Valores de  $\alpha$  e  $\beta^{**}$ , e mortalidade acumulada (%) de operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas a bioensaios de ingestão utilizando as frações solúveis em hexano, acetato de etila e metanol de *C. floribundus*, e as fases orgânica, aquosa e resíduo obtidas a partir da fração metanólica

Tratamento	Concentração mg g <sup>-1</sup>	Tempo Letal Mediano (TL <sub>50</sub> )	Valores de $\alpha$	Valores de $\beta$	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
						24 h	21 dias
Sulfloramida	0,3%	14,1	1,69	18,67	0,01e-01	0,70	70,47
Testemunha	-	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
Fração Hexano	200	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
	400	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
	600	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
Sulfloramida	0,3%	13,1	1,33	17,23	2,89e-30	2,24	72,77
Testemunha	-	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
Resíduo da	200	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
Fração Hexano	400	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
	600	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
Sulfloramida	0,3%	13	2,20	16,39	0,01e-01	0,21	82,18
Testemunha	-	>21	2,20	29,25	1,29e-11	0,05	38,26
Fração Acetato de Etila	200	20,6	2,20	24,23	1,39e-07	0,08	51,80
	400	17,5	2,20	20,61	8,96e-05	0,12	64,72

“Tabela 2, continuação”

<b>Tratamento</b>	<b>Concentração mg g<sup>-1</sup></b>	<b>Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>)</b>	<b>Valores de á</b>	<b>Valores de â</b>	<b>P-valor</b>	<b>24 h</b>	<b>21 dias</b>
	600	17,5	2,20	20,62	8,96e-05	0,12	64,72
Sulfloramida	0,3%	12,7	1,18	17,27	2,89 e-30	3,40	71,62
Testemunha	-	>21	1,18	57,56	4,34 e-14	0,83	26,23
Resíduo da	200	>21	1,18	36,81	4,34 e-14	1,40	40,29
Fração Acetato	400	>21	1,18	36,81	4,34 e-14	1,40	40,29
de Etila	600	>21	1,18	36,81	4,34 e-14	1,40	40,29
Sulfloramida	0,3%	6,7	1,32	8,74	2,87e-20	5,55	95,84
Testemunha	-	>21	1,32	27,71	1,17e-19	1,23	50,01
Fração	200	11	1,32	14,42	3,37e-08	2,90	80,54
Metanólica	400	16	1,32	20,82	7,04e-14	1,80	63,63
	600	11	1,32	14,42	3,37e-08	2,90	80,54
Sulfloramida	0,3%	7,9	1,22	10,85	0,01e-08	6,68	87,69
Testemunha	-	>21	1,22	36,05	1,29e-20	2,89	42,07
Fase Aquosa	200	>21	1,22	23,33	2,06e-12	1,78	58,88
	400	7,9	1,22	10,85	0,01e-08	6,68	87,69
	600	7,9	1,22	10,85	0,01e-08	6,68	87,69
Sulfloramida	0,3%	10,6	1,76	13,00	1,00 e-10	1,08	90,22

“Tabela 2, conclusão”

Tratamento	Concentração mg g <sup>-1</sup>	Tempo Letal Mediano (TL <sub>50</sub> )	Valores de á	Valores de â	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
						24 h	21 dias
Testemunha	-	>21	1,76	30,38	5,43e-24	0,24	40,67
Fase Orgânica	200	>21	1,76	30,38	5,43e-24	0,24	40,67
	400	19,1	1,76	23,49	1,94e-15	0,38	56,00
	600	19,1	1,76	23,49	1,94e-15	0,38	56,00
Sulfluramida	0,3%	10,4	1,69	12,89	1,00e-11	1,32	89,78
Testemunha	-	>21	1,69	28,81	1,48e-21	0,34	44,34
Resíduo das Fases	200	>21	1,69	28,81	1,48e-21	0,34	44,34
	400	19,7	1,69	24,41	6,63e-16	0,45	53,95
	600	19,7	1,69	24,41	6,63e-16	0,45	53,95
Sulfluramida	0,3%	9	1,19	12,19	6,63e-21	4,97	85,19
Testemunha	-	>21	1,19	70,95	7,47e-24	0,62	20,93
Ácido caurenóico	400	>21	1,19	70,95	1,14e-02	0,62	20,93

\* Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) é o tempo necessário de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste; \*\*α= parâmetro de forma e β parâmetro de escala.



*Croton floribundus* (Fração Acetato)

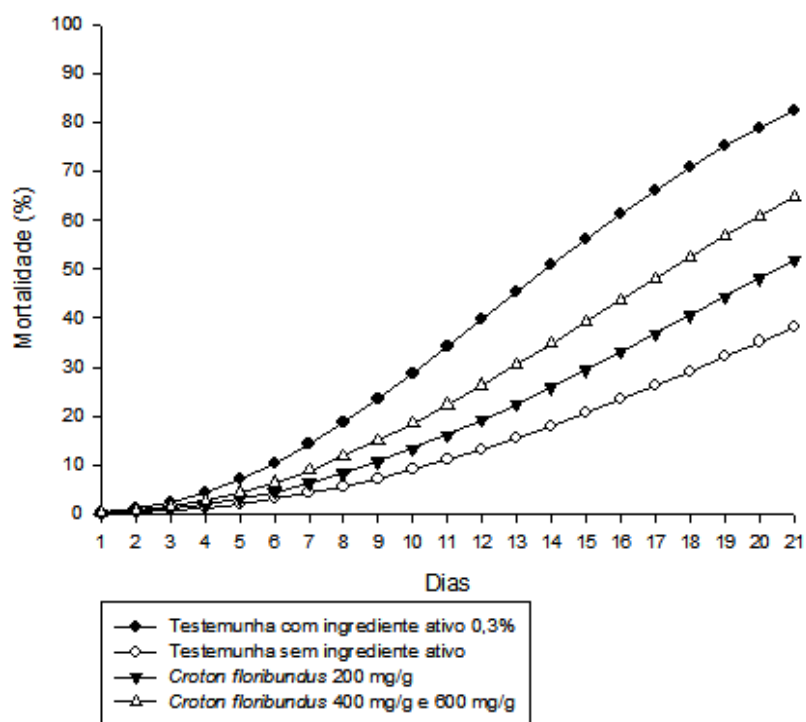


Figura 1 Toxicidade da fração acetato de etila de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A fração metanólica é representada por quatro curvas distintas (Tabela 2, Figura 2). A testemunha com ingrediente ativo sulfluramida 0,3% foi aquela que apresentou maior mortalidade ao longo do tempo (5,55% em 24 horas e 95,84% aos 21 dias,  $TL_{50}=6,7$  dias). A fração metanólica dentre todas as frações avaliadas foi aquela que apresentou maior potencial formicida com mortalidade de 80,54% aos 21 dias de avaliação e  $TL_{50}=11$  dias, formando grupos congêneres entre duas concentrações testadas (200 e 600 mg/g) (Tabela 2,

Figura 2). A terceira curva de mortalidade é representada pela concentração intermediária (400 mg.g<sup>-1</sup>), apresentando mortalidade entre 1,80 (24 horas) e 63,63% (21 dias); TL<sub>50</sub>=16 dias. A mortalidade mais baixa foi observada na testemunha sem ingrediente ativo, com mortalidade entre 1,23% (24 horas) e 50,01% (21 dias), TL<sub>50</sub>>21 dias (Figura 2).

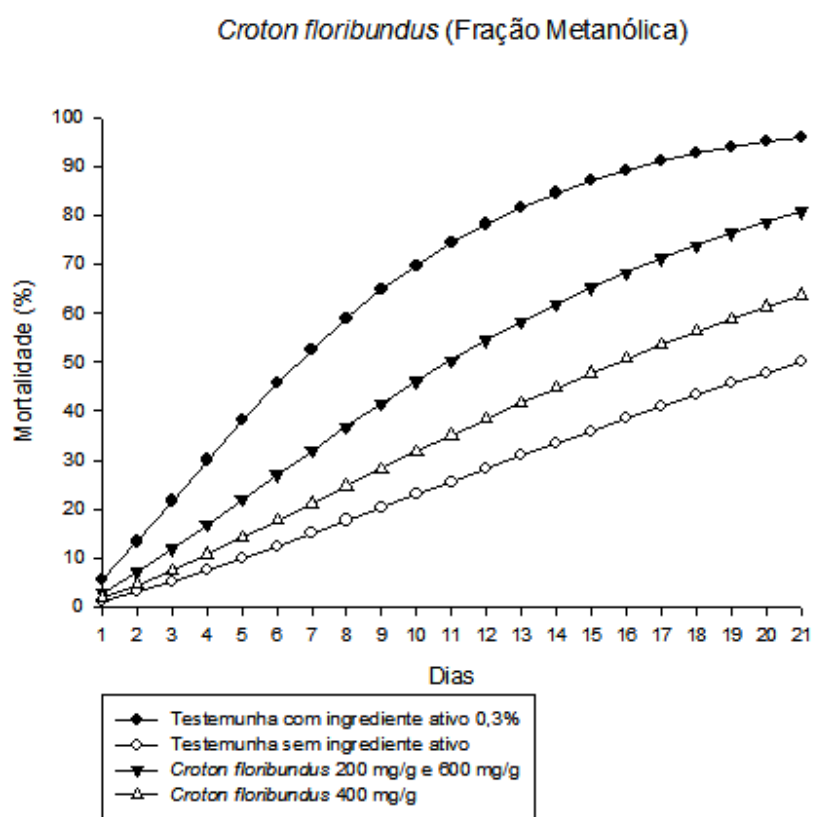


Figura 2 Toxicidade da fração metanólica de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

Devido a fração metanólica apresentar ação formicida, realizou-se o procedimento de partição líquido-líquido, o qual gerou duas fases: orgânica e aquosa. A fase aquosa apresentou elevado potencial formicida, o comportamento da curva de mortalidade nas maiores concentrações foi semelhante a mortalidade da testemunha com sulfluramida 0,3% (87,69 aos 21 dias,  $TL_{50}=7,9$  dias) e diferiu da testemunha sem ingrediente ativo (42,07% aos 21 dias,  $TL_{50}>21$  dias) e da menor concentração testada (200 mg.g<sup>-1</sup>) (58,88% aos 21 dias,  $TL_{50}>21$  dias) (Tabela 2, Figura 3).

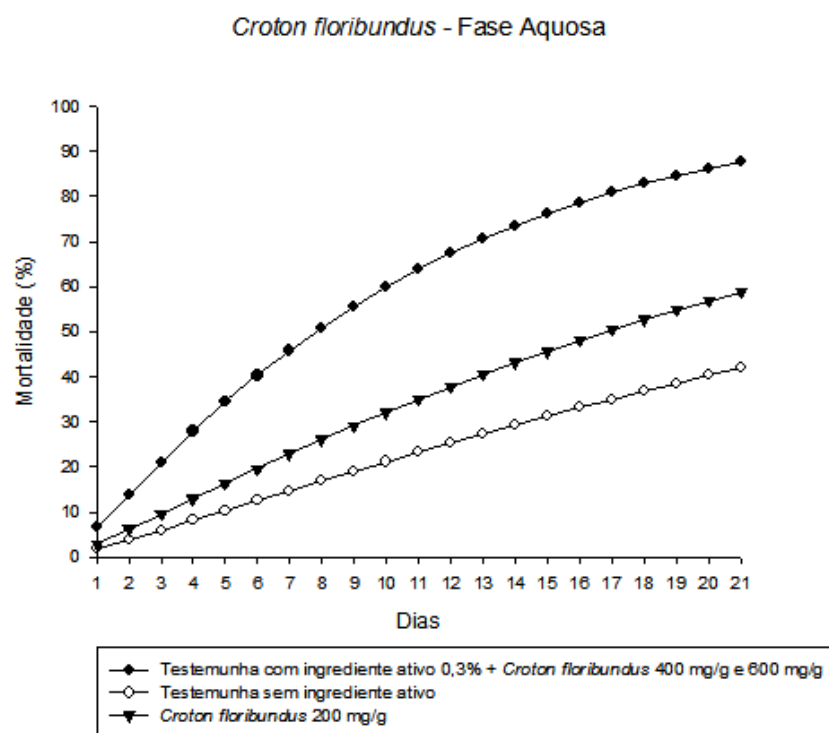


Figura 3 Toxicidade da fase aquosa de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

As frações hexano, resíduo da fração hexano, resíduo da fração acetato de etila, fase orgânica, resíduos das fases e a substância isolada (ácido caurenóico) de *C. floribundus* não apresentaram atividade formicida. Todas as concentrações avaliadas da fração hexano e do resíduo da fração hexano apresentaram comportamento da curva semelhante ao da testemunha sem ingrediente ativo, a mortalidade aos 21 dias de avaliação não excedeu a 38% e  $TL_{50} > 21$  dias (Tabela 2, Figuras 4 e 5). Esta curva de mortalidade diferiu significativamente da testemunha com ingrediente ativo, o qual apresentou elevada mortalidade ao final de 21 dias de avaliação ( $>70\%$ ),  $TL_{50} \leq 14$  dias.

#### *Croton floribundus* (Fração Hexano)

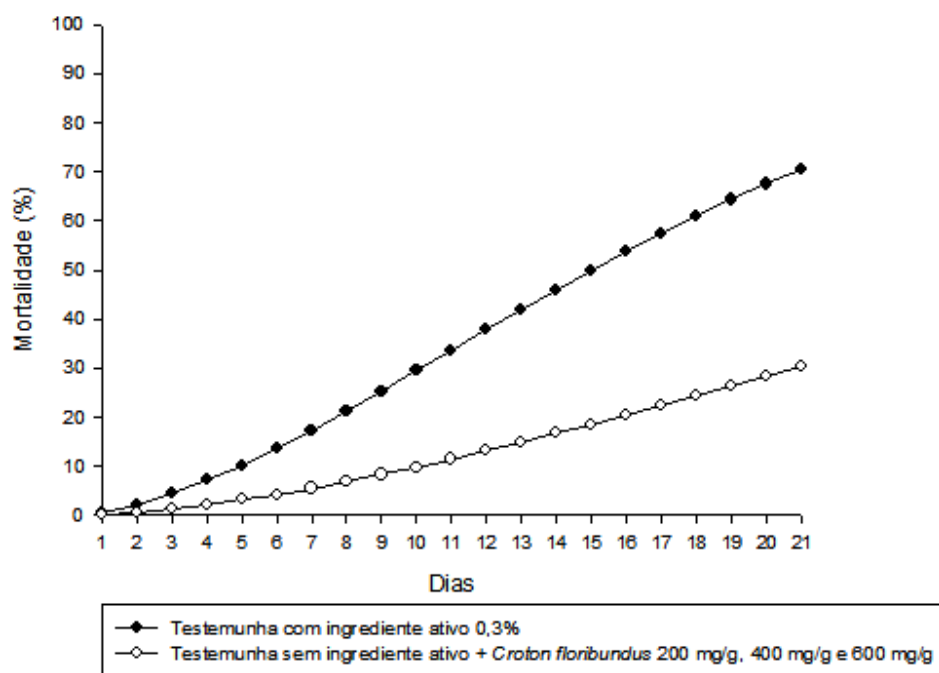


Figura 4 Toxicidade da fração hexano de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

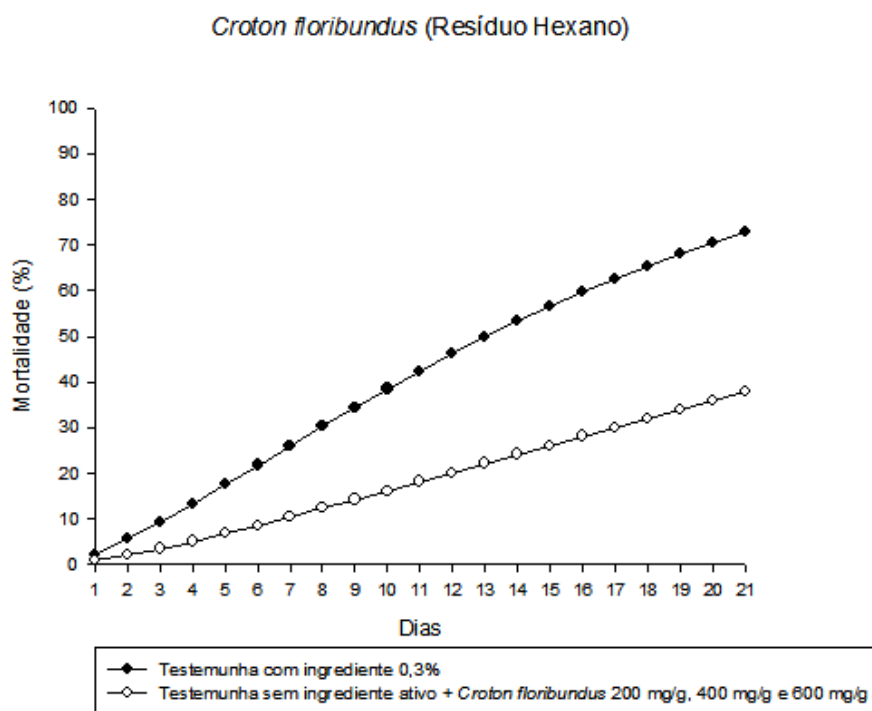


Figura 5 Toxicidade do resíduo da fração hexano de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O resíduo da fração acetato de etila apresentou três curvas distintas (Figura 6). Apesar de todas as concentrações terem diferido da testemunha sem ingrediente ativo (26,23% aos 21 dias), o mesmo apresentou baixa atividade formicida, pois a mortalidade foi inferior a 50% aos 21 dias de avaliação (40,29% aos 21 dias) e  $TL_{50} > 21$  dias (Tabela 2, Figura 6). A mortalidade da

testemunha com ingrediente ativo variou entre 3,40% (24 horas) e 71,62% (21 dias) e  $TL_{50}=12,7$  dias (Tabela 2, Figura 6).

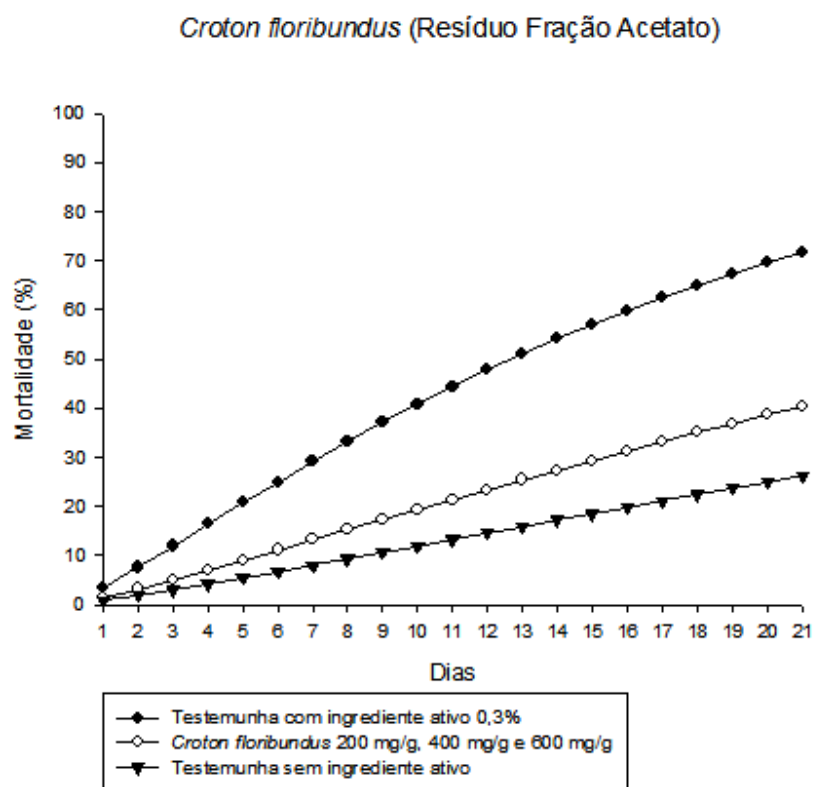


Figura 6 Toxicidade do resíduo da fração hexano de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A fase orgânica e o resíduo das fases não apresentaram resultados expressivos contra as formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* (Tabela 2, Figuras 7 e 8). Estas estão representadas por três curvas de mortalidade distintas. A primeira curva é referente a testemunha com ingrediente ativo sulfluramida, a

qual apresentou elevada mortalidade após 21 dias de avaliação (>89%) e  $TL_{50}>10,3$  dias. Já a menor concentração ( $200 \text{ mg.g}^{-1}$ ) formou grupo congênere com a testemunha sem ingrediente ativo, mortalidade menor que 45% após 21 dias de avaliação,  $TL_{50}>21$  dias. A terceira curva de mortalidade é representada pelas concentrações de 400 e 600  $\text{mg.g}^{-1}$ , os quais formaram grupos congêneres, com mortalidade um pouco maior que 53% após 21 dias de avaliação e  $TL_{50}=19,1$  dias (Figuras 7 e 8).

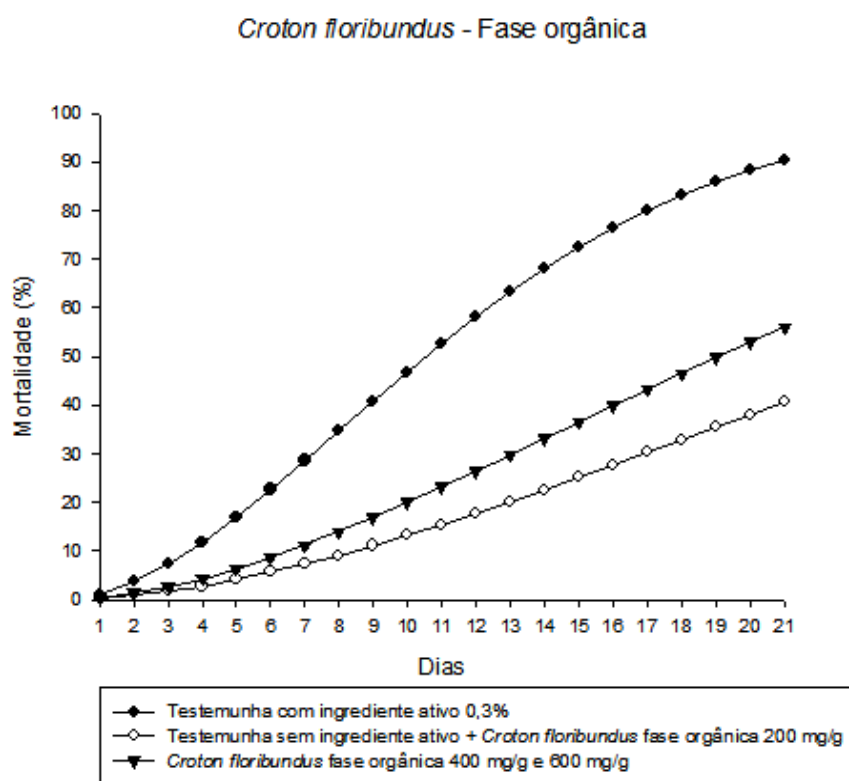


Figura 7 Toxicidade do resíduo da fase aquosa de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600  $\text{mg/g}$  de polpa cítrica

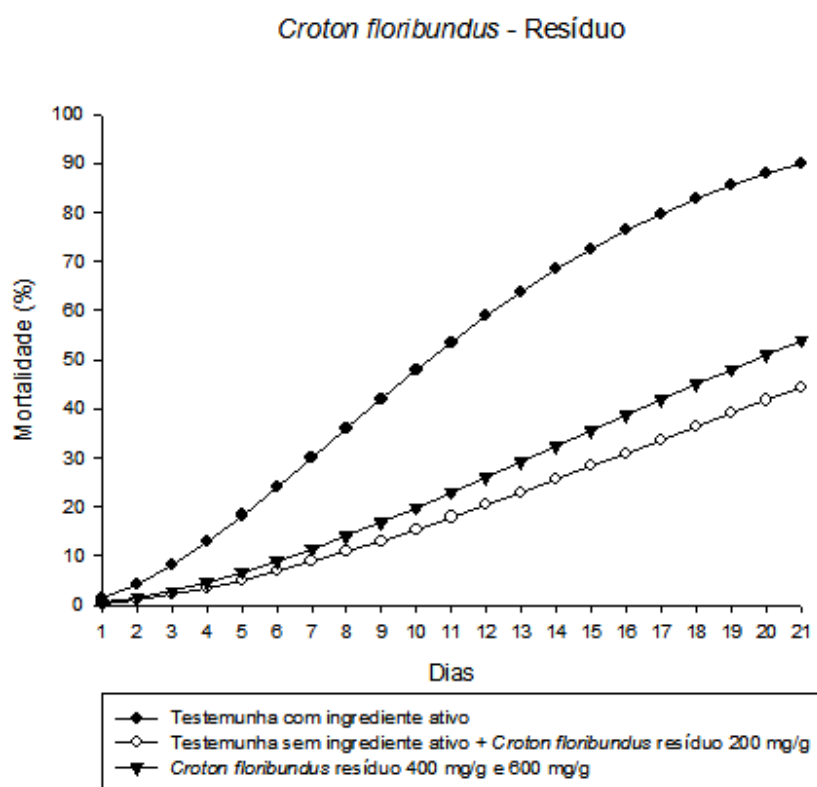


Figura 8 Toxicidade do resíduo das fases de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O ácido caurenóico isolado da fração acetato não apresentou atividade formicida contra operárias de *A. s. rubropilosa*. Este composto apresentou comportamento semelhante a testemunha sem ingrediente ativo, a mortalidade variou entre 0,62% em 24 horas e 20,93% após 21 de avaliação (Tabela 1, Figura 9). Já a testemunha com ingrediente ativo apresentou elevada mortalidade após 21 dias de avaliação (85,19%) e  $TL_{50}=9$  dias.



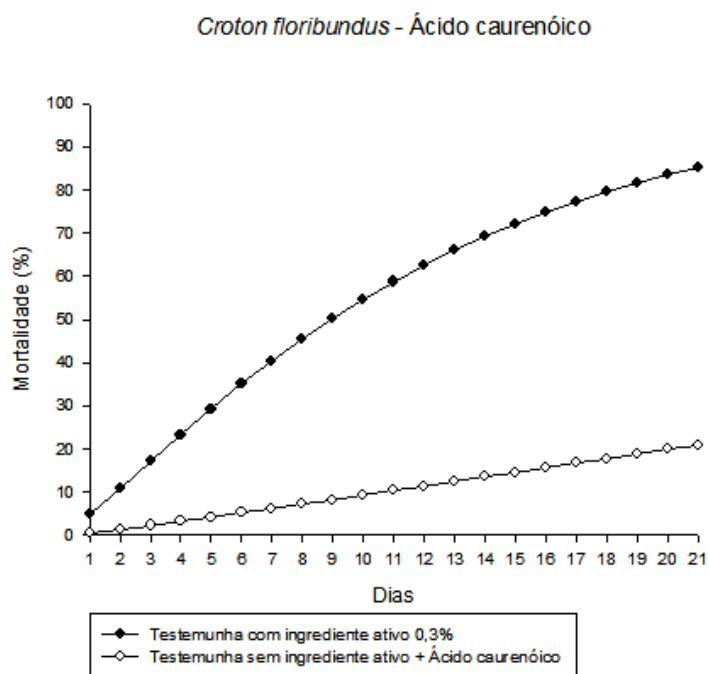


Figura 9 Toxicidade do ácido caurenóico isolado da fração acetato etila de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

#### 4 DISCUSSÃO

Dentre as frações avaliadas, a fração metanólica e sua fase aquosa, e a fração acetato de etila de extratos metanólicos de *Croton floribundus*, oferecidos via ingestão, apresentaram ação formicida. A ação formicida de tais frações já havia sido relatado para outras plantas, como exemplo temos as frações metanólicas de diclorometano e hexano, de folhas e ramos de *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae), frações metanólicas dos extratos em diclorometano e acetato etila de folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) (BIGI et al., 2004), fração metanólica de extrato hexânico de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) (BUENO et al., 2005), e a fração acetato de extratos metanólicos de *Virola sebifera* (Myristicaceae) (BICALHO et al., 2012). O fato de substâncias polares ou com polaridade intermediária apresentar ação formicida não se caracteriza como uma regra, já que há relatos de frações ou substâncias isoladas de natureza apolar que apresentaram atividade formicida e/ou fungicida (ARAÚJO et al., 2008; BIAVATTI et al., 2002; PEÑAFLORES et al., 2009).

A investigação fitoquímica da fração acetato de etila de *C. floribundus* levou ao isolamento do ácido *ent*-caur-16-en-19-óico, um diterpeno caurânico, já isolado a partir de *Croton argyrophyloides* (MONTE; DANTAS; BRAZ-FILHO, 1988), que apresenta um amplo espectro de bioatividades como antiinflamatória, antifúngica, antiulcerogênica (GHISALBERT, 1997), atividade moluscida, cercaricida (MEDINA et al., 2009) e inseticida. O ácido caurenóico apresentou atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas do *Tripanossoma cruzi* (VIEIRA et al., 2002). Além disso, inibiu o desenvolvimento de larvas de Lepidoptera (*Heliothis virescens* Fabricius, *Heliothis zea* Boddie e *Pectinophora gossypiella* Saunders), pragas da cultura do algodão (ELLIGER et al., 1976) e

ocasionou moderada atividade inseticida contra o coleóptero *Cylas formicarius* Fabricius, praga da cultura da batata-doce (PADMAJA et al., 1995).

Para o ácido caurenóico isolado da fração acetato etila não apresentou atividade formicida. Essa perda de atividade pode ter ocorrido durante as diferentes etapas de purificação, indicando que a atividade formicida pode ser atribuída a ação conjunta de compostos, ao invés da ação de uma única substância (BUENO et al., 2005; MORINI et al., 2005). Apesar de o estudo fitoquímico ter sido biodirecionado para o isolamento de substâncias majoritárias, nem sempre estas são responsáveis por tal atividade. Além do ácido caurenóico, há relatos de mais quatro diterpenos isolados dessa planta (2-candol B; 3-6-hidróxi caur-16-en-19-ol; 4-16-hidróxi-19-cauranoato de metila; 5-ácido 16 $\alpha$ , 17-diidroxi -19-cauranóico), além de um esteróide (sitosterol glicosilado) (PEIXOTO, 2003).

A atividade formicida de compostos terpenóides já havia sido relatada por Howard, Cazin e Wiemer (1988). Há relatos na literatura sobre o mecanismo de ação de alguns terpenóides em formigas cortadeiras. Foi observado comportamento agressivo em operárias de *A. s. rubropilosa* expostas ao terpenóide  $\beta$ -eudesmol, extraído de *E. maculata*. Em nossos experimentos, foi possível observar formigas mutiladas, apesar destas não terem sido quantificadas. Tal fato, já havia sido observado em experimentos anteriores com o extrato bruto desta planta. O terpenóide  $\beta$ -eudemol é capaz de modificar a composição química da cutícula das operárias, interferindo no reconhecimento das companheiras de ninho e provocando comportamento de alarme e agressão (MARINHO et al., 2005, 2008). Esse comportamento já havia sido observado por North, House e Jackson (2000) quando as operárias de *A. sexdens* foram expostas ao composto cariofileno, o qual pode funcionar como feromônio de alarme. Além disso, já foi detectado que alguns terpenóides (eugenol,  $\alpha$ -terpineol) podem causar sinais de toxicidade, como mudanças no batimento

cardíaco e no nível de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico) no sistema nervoso, além do bloqueio da atividade dos receptores octomapínicos em baratas (ENAN, 2001).

Em outras espécies de *Croton*, tal como *Croton eluteria* (L.) W. Wright foi detectada a presença de eugenol (BOULOGNE et al., 2012). Essa substância química já havia sido testada contra *Solenopsis invicta* Buren e *Camponotus pennsylvanicus* De Geer, e apresentou efeito repelente e ação formicida, respectivamente (CHEN, 2009; ENNAN, 2001). Em estudo fitoquímico de *C. cajucara* foi detectado a presença de ácido vanílico (MACIEL et al., 2007). Este composto isolado de *Policarpus grandiflorus* apresentou efeito fungicida contra *L. gongylophorus* e inibiu o crescimento fúngico em 80% se comparado ao controle (GODOY et al., 2002). O ácido palmítico presente em *Croton* sp. (KAO CORP, 2011), isolado de *R. communis* apresentou efeito fungicida, inibindo 81% do crescimento fúngico se comparado ao controle. A ação combinada inseticida+fungicida pode acarretar na eliminação total do formigueiro.

A fase aquosa de *C. floribundus* apresentou ação formicida e comportamento da curva de mortalidade foi semelhante ao inseticida comercial sulfluramida 0,3%. Vale ressaltar a importância de novas moléculas químicas que possuam similaridade com a sulfluramida. A mortalidade deste inseticida é baixa em 24 horas e aumenta no decorrer dos 21 dias de avaliação pós-ingestão da pasta. O aumento da mortalidade observado nos experimentos e a persistência dos sintomas de intoxicação: caracterizado por: movimento lento, paralisia e distendimento das pernas traseiras, e sintomas de diarreia indicando que as operárias de *A. sexdens* apresentam dificuldades de destoxificação do inseticida. A não destoxificação é uma característica estreitamente ligada a ação retardada de um ingrediente ativo, que é expresso principalmente após 24 horas (NAGAMOTO et al., 2004). A ação retardada de ingredientes ativos para

formulação de formicidas é uma característica essencial, já que as colônias de formigas cortadeiras são muito populosas e o controle de um ninho depende da contaminação de todos os indivíduos. Caso as formigas detectem que o substrato utilizado não foi adequado elas deixam de carregá-los, podendo inclusive retirar partes do fungo simbiote contaminado com esse substrato isolando-os nas câmaras de lixo (BRUGGER et al., 2008).

## 5 CONCLUSÃO

A fração acetato de etila, a fração metanólica e a fase aquosa da fração metanólica de *C. floribundus* apresentaram atividade formicida contra formigas cortadeiras do gênero *Atta sexdens* quando foram oferecidos via ingestão. O ácido caurenóico isolado da fração acetato de *C. floribundus* não apresentou atividade formicida. Mais pesquisas devem ser realizadas com estas frações visando o isolamento de moléculas com atividade formicida para possível uso em iscas tóxicas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. A. et al. Toxicity of substances isolated from *Helieta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2007.
- AMBROZIN, A.R.P. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 542-547, 2006.
- ANJOS, N.; MOREIRA, D.D.O.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamentos. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG: UFV, 1993. p. 212-241.
- ARAÚJO, M. da S. et al. Toxicidade de extratos hexânicos de plantas as operárias de *Atta laevigata* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Formicidae: Attini). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 3/4, p. 106-114, 2008.
- BIAVATTI, M.W. et al. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and x-ray structure of flindersiamine. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 66-70, 2002.
- \_\_\_\_\_. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata* x-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, 2005.
- BICALHO, K. U. et al. Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche: a Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- BIGI, M. F. M. A. et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.

BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, New York, v. 10, n. 4, p. 325-347, Dec. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 7 nov. 2010.

BRUGGER, M. S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de extratos hexânicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1958) (Formicidae, Attini). **Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 3, p. 233-238, 2008.

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

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**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

CHEN, J. Repellency of an over-the-counter essential oil product in china against workers of red imported fire ants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 2, p. 618-622, Jan. 2009.

CINTRA, P. et al. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 347-353, 2005.

ELLIGER, C.A. et al. Diterpene acids as larval growth inhibitors. **Experientia**, Basel, v. 32, n. 11, p. 1364-1366, 1976.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Oxford, v. 130, n. 3, p. 325-337, Nov. 2001.

GAJO, G.C. **Seleção virtual de substâncias inibidoras da corismato mutase de *Meloidogne incognita* e estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade de *Croton floribundus* Spreng para *Atta sexdens***. 116p. 2013. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.



GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, Milano, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.

GODOY, M.F.P. et al. Toxicidade de *Pilocarpus grandiflorus* para o fungo simbiote de *Atta sexdens*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 69, p. 1-306, 2002.

HOWARD, J.J.; CAZIN, J.; WIEMER, D.F. Toxicity of terpenoid deterrents to the leaf-cutting *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 14, n. 1, p. 59-69, 1988.

ISENRING, R.; NEUMEISTER, R. **Insecticides for control of pest insects in FSC certified forests in Brazil**: recommendations by technical advisors. Disponível em: <[http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA\\_Rec\\_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-Fipronil-Sulfluramid\\_BR\\_2010.pdf](http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA_Rec_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-Fipronil-Sulfluramid_BR_2010.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2011.

KAO CORP. **Cockroach attractant**: contains extract of *Croton* partic cascarilla oil or p-cymene, eugenol, cascarillic-, palmitic- and stearic acid. Disponível em: <[http://apps.webofknowledge.com.ez26.periodicos.capes.gov.br/summary.do?SID=1E316HMclFN5i55Pf39&product=UA&qid=2&search\\_mode=GeneralSearch](http://apps.webofknowledge.com.ez26.periodicos.capes.gov.br/summary.do?SID=1E316HMclFN5i55Pf39&product=UA&qid=2&search_mode=GeneralSearch)>. Acesso em: 5 jan. 2011.

MACIEL, M.A.M. et al. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against ehrlich carcinoma and human k562 leukemia cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 391-396, 2007.

MARINHO, C.G.S. et al.  $\beta$ -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 117, n. 1, p. 89-93, Jan. 2005.

\_\_\_\_\_. Interference of  $\beta$ -eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 98, n. 5, p. 467-473, 2008.

MEDINA, J. M. et al. Evaluation of the molluscicidal and *Shistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 1B, p. 207-211, 2009.

MONTE, F. J. Q.; DANTAS, E. M. G.; BRAZ-FILHO, R. New dipertenoids from *C. argyrophyloides*. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, n.10, p. 3209-3212, 1988.

MORINI, M. S. C. et al. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

NAGAMOTO, N. S. et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 413-431, 2004.

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

PADMAJA, V. et al. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 48, n. 1, p. 21-24, Aug. 1995.

PEIXOTO, J.L.B. **Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae)**. 2003. 88p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

PEÑAFLORES, M. F. G. V. et al. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**, reference index version 2.2.1. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2005. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 jan. 2010.

STILL, W. C.;KAHN, M.;MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 43, n.14, p. 2923-2925, July 1978.

TEREZAN, A.P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 882-886, Sept. 2010.

THERNEAU, T. **Survival**: survival analysis, including penalised likelihood. R Package Version 2.35-8. Disponível em: <<http://r-forge.r-project.org>>. Acesso em: 15 out. 2011.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Persistent organic pollutants review committee**: risk management evaluation on perfluorooctane sulfonate. Stockholm, 2007. Disponível em: <[http://chm.pops.int/Portals/0/docs/from\\_old\\_website/documents/meetings/poprc/chem\\_review/PFOS/PFOS\\_RME\\_e.pdf](http://chm.pops.int/Portals/0/docs/from_old_website/documents/meetings/poprc/chem_review/PFOS/PFOS_RME_e.pdf)>. Acesso em: 7 nov. 2011.

VIEIRA, H.S. et al. Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 151-157, 2002.

ZANETTI, R. **Manejo integrado de formigas cortadeiras e cupins em áreas de eucalipto da Cenibra**. Belo Oriente: CENIBRA, 2007. 74 p. Laudo técnico FSC.

**CAPÍTULO 4 Avaliação da toxicidade das frações de *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae) em operárias de *Atta sexdens* (Formicidae) e de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) e *Zanthoxylum pohlianum* sobre o seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricaceae)**

**RESUMO**

Avaliou-se a toxicidade das frações de *Croton floribundus* e *Zanthoxylum pohlianum* contra *Leucoagaricus gongylophorus* e de *Z. pohlianum* contra *A. sexdens*. As frações (hexânica, acetato etila e metanólica) e as fases (aquosa e orgânica) obtidas de *Z. pohlianum* foram oferecidas via ingestão às formigas cortadeiras. Em cada tratamento avaliado, utilizaram-se duas testemunhas, uma sem e outra com sulfluramida (0,3%). Em cada tratamento usaram-se seis repetições em placas de Petri, contendo 20 formigas cada. As frações e as fases foram dissolvidos em metanol e adicionado o pó da polpa cítrica nesta solução, com remoção do solvente. As formulações foram finalizadas com solução de sacarose (10%) e adicionaram-se 2g desta por placa. As mesmas foram removidas depois de 24 horas e adicionou-se dieta artificial para as formigas. A mortalidade destes insetos foi avaliada após a aplicação da formulação. Submeteu-se os dados à análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Nos testes fungicidas, extratos brutos e frações de *C. floribundus* e *Z. pohlianum* foram solubilizados em 1000 µL e 500 µL de DMSO, respectivamente. Utilizaram-se tubos falcon, no qual se adicionaram o meio de cultura (50 mL) e o extrato vegetal solubilizado, na concentração desejada. Adicionou-se 10 mL desta combinação por placa de Petri. Os halos de 0,5 cm<sup>2</sup> de diâmetro foram transferidos para as placas de Petri contendo o meio de cultura com o substrato. Avaliou-se ainda duas testemunhas, uma continha apenas o meio de cultura e a outra, o meio de cultura + solvente. Mantiveram-se os tratamentos em sala climatizada (26°C) por 30 dias. As placas foram escaneadas para mensurar o crescimento fúngico. Realizou-se análise estatística das avaliações do 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias. A diferença entre a testemunha e os tratamentos foi realizada por meio do teste F (Anova) (0,05%). Removeram-se fragmentos fúngicos e realizaram-se lâminas, as quais foram visualizadas em microscópio. As placas dos tratamentos utilizados no experimento anterior serviram de inoculo para nova etapa. Realizaram-se halos de 0,5 cm de diâmetro e estes

foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura. O fungo simbiote cresceu durante 30 dias, à 26°C. Utilizou-se o mesmo procedimento para a realização das análises microscópicas e macroscópicas. Nos testes formicidas, a fração metanólica e a fase aquosa de *Z. pohlianum* foram tóxicas a *A. sexdens*. Nos testes com o fungo simbiote, o extrato bruto de *C. floribundus* apresentou crescimento fúngico reduzido em 40% se comparado à testemunha (DMSO 1000 µL). A fração metanólica de *C. floribundus* e sua fase aquosa potencializaram o crescimento fúngico em 76 e 173%, respectivamente, se comparado à testemunha (DMSO 500 µL). No entanto, essa testemunha e a fração metanólica de *C. floribundus* não formaram gongílideos, enquanto a fase aquosa observou-se sua formação. A fração acetato etila e a fase aquosa de *Z. pohlianum* também estimularam o crescimento do fungo em 57% e 73%, respectivamente, porém nestes tratamentos não foi evidenciado a formação de gongílideos. No segundo experimento, o crescimento fúngico dos tratamentos foi semelhante ao das testemunhas. No entanto, a fração hexano e a fase orgânica de *C. floribundus*, e a fração acetato etila e fase aquosa de *Z. pohlianum* não apresentaram formação de gongílideos. Estes substratos apresentaram atividade fungistática em sua produção.

Palavras-chave: Atividade fungistática. Controle químico. Plantas com atividade inseticida.

## ABSTRACT

We assessed the fraction toxicities of *Croton floribundus* and *Zanthoxylum pohlianum* against *L. gongylophorus* and the fraction toxicity of *Z. pohlianum* against *A. sexdens*. Ants were feed via ingestion with fractions of hexane, ethyl acetate, and methanol, as well as the phases (aqueous and organic) obtained from *Z. pohlianum*. In each assessed treatment, we used two controls: with or without sulfluramid (0.3%). For each treatment there were six replications for Petri dishes containing 20 ants. Fractions and phases were dissolved in methanol and citrus pulp was added in this solution, removing the solvent. In each treatment 2 g of formulation were added per Petri dish. Petri dishes were removed after 24 hours and artificial diet was applied. Insect mortalities were assessed after formulation application. Data were subjected to analysis of survival by using Weibull distribution. In relation to fungicide tests, crude extract extracts and fractions of *C. floribundus* and *Z. pohlianum* were solubilized in 1000  $\mu$ L and 500  $\mu$ L of DMSO, respectively. Culture medium (50 mL) and solubilized plant extract in were added in Falcon tubes. A combination of each one (10 mL) was added per Petri dish. Disk of 0.5 cm in diameter were transferred to Petri dishes containing culture medium with the substrate. Controls were also assessed, one containing only culture medium and the other one culture medium + solvent. Treatment remained in a climated room (26 °C) for 30 days. Then, Petri dishes, were scanned to measure fungal growth. Statistical analysis were performed for 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> assessed days. The difference between control and treatments was analyzed by F test (ANOVA) (0.05%). Fungal fragments were removed and slides were prepared and visualized under microscope. Petri dishes of the previous experiment were used as inoculum for the next essay. Disk of 0.5 cm in diameter were transferred to Petri dishes containing culture medium. The symbiotic fungus grown for 30 days at 26°C. The same procedure to perform the microscopic and macroscopic analyzes was used. Regarding formicide tests, the methanolic fraction and *Z. pohlianum* aqueous phase were toxic to *A. sexdens*. In relation to symbiotic fungus tests, the crude extract of *C. floribundus* showed fungal growth reduced by 40% compared to control (DMSO 1000  $\mu$ L). The *C. floribundus* methanolic fraction and its aqueous phase potentiated the fungal growth in 76 and 173%, respectively, compared to control (DMSO 500  $\mu$ L). However, both control and *C. floribundus* methanolic fraction formed gongylidia, while it was observed in aqueous phase. The ethyl acetate fraction as well as *Z. pohlianum* aqueous phase also promoted fungus growth in 57% and 73%, respectively, although there were not found gongylidia formation for these treatments. In the second experiment, the fungal growth was similar compared to controls treatments. Nevertheless,

there were not found gongylidia formation for hexane fraction, *C. floribundus* organic phase, ethyl acetate fraction, and *Z. pohlianum* aqueous phase. These substrates showed fungistatic activity in its production.

Keywords: Fungistatic activity. Chemical control. Plants with.

## 1 INTRODUÇÃO

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) têm sido de considerável preocupação a saúde pública e ao meio ambiente por várias décadas, pois são substâncias orgânicas que persistem no ambiente. Eles podem ser transportados a longas distâncias (meia vida atmosférica  $> 2$  dias), são tóxicos (ex. toxicidade aguda em peixes:  $CL_{50}=4,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), capazes de bioacumulação (encontrados em elevada concentração em predadores de cadeia), e representam risco de causar efeitos adversos para os animais e a saúde humana. A exemplo disso têm-se p desenvolvimento do câncer, defeitos de nascimento, disfunção imune e do sistema reprodutivo, e maior suscetibilidade a doenças (UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE - UNECE, 2010).

Como medida para o controle e mitigação as ameaças dos POPs, um tratado internacional entrou em vigor em 2004, chamado de Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, a qual listou inicialmente 12 produtos químicos, também chamados de "dúzia suja" para exclusão ou restrição do seu uso (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP, 2011).

Um dos POPs restringidos é osulfonato de perfluorooctano (PFOS) e seus subprodutos, os quais têm sido usados em aplicações em espumas contra incêndios, tapetes, vestuário, estofados e embalagens, revestimentos e aditivos de revestimento, produtos de limpeza, pesticidas e inseticidas, como a sulfuramida (UNECE, 2010).

Esta por sua vez é utilizada na formulação de iscas formicidas para o controle de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* que são consideradas pragas-chave de diversas culturas no Brasil. O status de praga-chave é em decorrência das altas quantidades de vegetais que são cortados e



transportados ao fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) (Möller) Singer (Agaricales: Agaricaceae). Esse comportamento prejudica o desenvolvimento de plantas de importância agrícola e florestal, fazendo com que cerca de 12 mil toneladas de iscas sejam produzidas por ano (BOARETO; FORTI, 2011).

As iscas formicidas granuladas representam o método mais utilizado no controle destes insetos. Elas são constituídas por uma mistura de atraentes (celulose geralmente de laranja e óleo vegetal) e o ingrediente ativo (inseticida), apresentando a forma de *pellets* (BOARETTO; FORTI, 2011). Embora método de baixo custo e alta eficiência, também apresenta riscos ao meio ambiente e a saúde do aplicador, devido aos princípios ativos atuais, sob restrição. Em busca de novas moléculas químicas, visando a substituição da sulfluramida como principal ingrediente ativo nas iscas formicidas, têm sido estudados os extratos vegetais, incluindo a família Rutaceae e Euphorbiaceae (BIAVATTI et al., 2002, 2005; TEREZAN et al., 2010), que apresentem efeito tóxico para as formigas cortadeiras e para seu fungo simbiote.

De acordo com Biavatti et al. (2002), os alcalóides furoquinolínicos (esquimianina, cocusaginina, maculina e flindersiamina) isolados de caules e folhas da *Raulinoa echinata* (Rutaceae) foram tóxicos ao fungo simbiote *L. gongylophorus*. O ácido limonéxico isolado dos caules desta planta, reduziu significativamente a longevidade das operárias de *Atta sexdens* (11 dias) se comparado ao controle (22 dias) (BIAVATTI et al., 2005). Os alcalóides furoquinolínicos (dictamina,  $\gamma$ -fagarina e esquimianina) e 2-arilquinolin-4-ona (2-fenil-1-metilquinolin-4-ona), e limonoides (ácido limonéxico e limonina) extraídos dos galhos de *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) apresentaram atividade tóxica em operárias de *A. sexdens* e seu fungo simbiote (TEREZAN et al., 2010). O ácido palmítico presente na fração metanólica de

extratos hexânicos de folhas de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) inibiu 81% o crescimento do fungo simbionte (BIGI et al., 2004).

Devido a ação fungicida e/ou formicida destas famílias das famílias Euphorbiaceae e Rutaceae, objetivou-se avaliar o potencial das frações de *Zanthoxylum pohlianum* para futuro uso em iscas tóxicas sobre *Atta sexdensrubropilosa* em condições de laboratório, e ainda avaliar a atividade fungicida das frações de *Z. pohlianum* e *C. floribundus* em *L. gongylophorus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do extrato bruto de *Croton floribundus* e *Zanthoxylum pohlianum*

O material vegetal de *Croton floribundus* Spreng (casca), Família Euphorbiaceae foi coletada no Viveiro Florestal da UFLA/Lavras, Minas Gerais. Já *Zanthoxylum pohlianum* Engl. (folha), Família Rutaceae foi coletado na Mata da sub-estação da UFLA/Lavras, Minas Gerais. Estas planta foram identificadas e as exsicatas encontram-se depositadas no Herbário Esal/UFLA com os números de registro de 26281 e 26941, respectivamente.

O material vegetal de *C. floribundus* e *Z. pohlianum* foram secos em estufa de ventilação forçada, a 40 °C, durante 48 horas, moídos e armazenados em freezer (-14 °C). Na etapa de extração foi utilizado o peso seco de 1322 g de *C. floribundus* (casca) e 1345 g de *Z. pohlianum* (folha). O material vegetal de cada planta foi dividido em partes de 50 g, e colocadas em frascos de vidro (475 mL), no qual adicionou-se 150 mL de metanol. Depois do extrato ter sido submetido a maceração em metanol por 24 horas, o mesmo passou por um processo de filtração, utilizando-se algodão hidrófilo. Este procedimento foi realizado por mais sete vezes para a extração do máximo possível de substâncias dos tecidos vegetais. Para as filtrações se utilizou um frasco de kitassato acoplado a um sistema devácuo através de mangueira. O solvente utilizado nas extrações foi removido em evaporador rotatório. A seguir, para a total remoção da umidade, os resíduos obtidos foram totalmente secos por liofilização durante um período de 24 horas, obtendo-se assim o extrato bruto metanólico de *C. floribundus* (EBMeOH), com massa de 290 g e *Z. pohlianum*, com massa de 120,98 g.

## 2.2 Fracionamento do extrato vegetal de *Croton floribundus* e *Zanthoxylum pohlianum*

O fracionamento foi realizado com 240,04 g de *C. floribundus* e 104,98 gramas do extrato bruto metanólico de *Z. pohlianum*. Para realizar o fracionamento foram utilizados três solventes, o hexano, acetato de etila e metanol. A massa dos extratos vegetais foram divididos em quatro balões (500 mL) e estes foram utilizados para efetuar as lavagens com os solventes. O primeiro solvente utilizado foi o hexano, sendo utilizado 120 mL em cada balão de *Z. pohlianum* e 225 mL em cada balão de *C. floribundus*. A mistura resultante foi agitada por 20 minutos e, após repouso por 10 minutos, filtrou-se a referida mistura em algodão hidrófilo, utilizando-se de um frasco de kitassato acoplado a um sistema de vácuo através de mangueira. Este procedimento de lavagem foi realizado por mais sete vezes para *Z. pohlianum* e oito vezes para *C. floribundus*. Utilizou-se como padrão a coloração, visto que no momento em que a cor tornou-se mais clara e estável, as lavagens foram finalizadas. Observou-se a formação de um precipitado na fase líquida de *C. floribundus*, o qual foi separado por filtração e submetido a remoção do solvente em evaporador rotatório e liofilizadora.

Posteriormente, a resíduo resultante insolúvel em hexano foi submetido ao mesmo processo de extração, empregando-se acetato de etila (polaridade intermediária) no lugar do hexano, sendo realizadas 6 extrações para *Z. pohlianum* e *C. floribundus*. Observou-se a formação de um precipitado na fase líquida de *C. floribundus*, o qual foi separado por filtração e submetido a remoção do solvente em evaporador rotatório e liofilizadora. A fase líquida, a qual foi solúvel em acetato de etila foi filtrado e removido o solvente como descrito anteriormente. O resíduo insolúvel em acetato de etila foi lavado em metanol, sendo este procedimento realizado por 7 vezes para *Z. pohlianum* e 9

vezes para *C. floribundus*. No final da lavagens com os solventes, sobrou o resíduo apenas de *Z. pohlianum*, o qual não foi solúvel em nenhum dos solventes citados, já *C. floribundus* foi completamente solubilizado.

As frações obtidas foram concentradas até secura em evaporador rotatório e posteriormente liofilizadas, obtendo as seguintes frações de *C. floribundus*: Fração hexânica (FH) 23,91g, Resíduo da Fração hexânica (RFH) 6,47g, Fração acetato de Etila (FAcOet) 15,96g, Resíduo da Fração acetato de etila (RFAcOet) 2,55 g, e a Fração metanólica (FMeOH) 166,60 g.

Com relação a *Z. pohlianum* foi obtida as seguintes frações: Fração hexânica (FH) 23,86 g, Fração acetato de Etila (FAcOet) 2,22 g, Fração metanólica (FMeOH) 65,81 g e o resíduo das frações (RF) 1,24 g. Todas as frações foram submetidas ao teste em laboratório, para que se possa saber em qual delas se encontram as substâncias ativas.

### **2.3 Partição Líquido-líquido dos extratos metanólicos de *Croton floribundus* e *Zanthoxylum pohlianum***

A fração metanólica (FMeOH) de *C. floribundus* (8 g) e *Z. pohlianum* (6 g) foram solubilizadas em diclorometano (60 e 40 mL, respectivamente) e transferidos para um funil de decantação (500 mL) e adicionado água (180 e 120 mL, respectivamente). Ambos os funis de decantação foram agitados vigorosamente por 20 minutos e, após 10 minutos, removeu-se a fase inferior (diclorometano) e foram adicionados mais 60 e 40 mL aos funis de *C. floribundus* e *Z. pohlianum*, respectivamente, para que o processo fosse repetido. Todo o procedimento de partição foi repetido até que a cor da fração inferior ficasse estabilizada (bem clara). Para a fração *C. floribundus* e *Z. pohlianum* foram realizadas 5 e 3 lavagens com diclorometano, respectivamente. Após cinco etapas de partição de *C. floribundus*, as fases coletadas (diclorometano)

foram centrifugadas para separá-las de uma fase intermediária, com o aspecto de uma gosma, que se formou durante o processo de partição. Em seguida, combinaram-se as fases de diclorometano e removeu-se o solvente em evaporador rotatório e liofilizadora. As fases intermediária e superior (aquosa) também foram concentradas, solvente removido e liofilizadas. As fases e massa resultantes de *C. floribundus* foram: fase aquosa 4,90 g; fase orgânica 0,82 g e resíduo (fase intermediária) 1,39 g. Já *Z. pohlianum*, após três lavagens com diclorometano recolheu-se a fase líquida solúvel neste solvente e a fase líquida solúvel em água. No entanto, ocorreu a formação de um resíduo, o qual não foi solúvel em nenhum destes solventes, desta forma, obteve-se a fase aquosa (4,26 g), fase orgânica (0,47 g) e resíduo das fases (0,54 g).

## **2.4 Experimentos em condições de laboratório**

### **2.4.1 Teste formicida**

Os testes foram executados segundo a metodologia adaptada de Nagamoto et al. (2004). No laboratório de Manejo Integrado Florestal da UFLA existem seis ninhos adultos já estabelecidos, os quais são mantidos em sala climatizada, com temperatura de  $21 \pm 2$  °C, 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de 70%. Nos bioensaios de toxicidade *in vitro* de ingestão, utilizaram-se operárias de *Atta sexdens rubropilosa* retiradas dos mesmos ninhos adultos, sendo estes ninhos adultos revezados em cada bioensaio.

Nos experimentos foram utilizadas operárias de tamanho médio, cujas massas variaram entre 10 e 20 mg, e cápsulas cefálicas entre 2,0 e 2,8 mm. Utilizou-se 10 exemplares de formigas cortadeiras, as quais a cápsula cefálica foi medida com auxílio de um microscópio óptico e as mesmas foram pesadas e

guardadas em frascos de vidro. Estas foram utilizadas como base para a coleta de novas operárias.

Nestes experimentos se avaliou as frações solúveis em hexano, acetato de etila e metanol do extrato bruto metanólico de *Z. pohlianum*. Também foi avaliado o resíduo das frações, aquele o qual não foi solúvel nos solventes utilizados, bem como as frações obtidas durante o processo de partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato da mencionada planta: fase aquosa, orgânica e o resíduo das fases, obtida durante a partição. Empregaram-se duas testemunhas: uma sem ingrediente ativo e a outra com o ingrediente ativo sulfluramida (sulfluramida técnica a 93%). Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, sendo cada uma composta por 20 formigas por placa de Petri de 10 cm de diâmetro, forrada com papel-filtro.

Para a condução do experimento se utilizou polpa cítrica, a qual é utilizada em iscas comerciais com a finalidade de tornar mais palatável para as formigas. O bagaço da laranja (polpa cítrica) foi desidratado em estufa por três dias a 40°C e, em seguida, foi triturado em liquidificador por várias vezes e passado em uma malha fina (0,50 mm) até apresentar o aspecto visual de pó homogêneo. Este pó correspondeu ao que doravante será chamado simplesmente de polpa cítrica.

As frações e as fases foram dissolvidas em metanol (+/-30 mL), resultando em uma solução, a qual foi adicionada o pó da polpa cítrica (6 g). No caso do ingrediente ativo se utilizaram 45 mL de acetona no lugar do metanol. As misturas resultantes foram homogeneizadas com frequente agitação manual (10 minutos) e ultrassom (5 minutos, potência 1400 A). A seguir, o solvente foi removido de cada mistura em evaporador rotatório e, imediatamente antes do início do experimento, adicionou-se uma solução de sacarose a 10% (g/mL) até que fosse obtida uma pasta homogênea ( $\pm$  20 mL), que fosse palatável para as formigas.

Utilizaram-se três concentrações para cada uma das amostras. Para determinar as massas das frações e fases a serem utilizadas nestes experimentos foram realizados cálculos proporcionais de massa de acordo com aquelas utilizadas nos experimentos com extratos brutos. No caso do extrato bruto isto corresponde ao emprego de 200 mg, 400 mg e 600 mg em experimentos anteriores. Quanto as frações, a massa utilizada em cada experimento (MFR) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:  $MFR = ((CEB*6)*MF)/MTEB*1,2$ ; onde CEB é a Concentração do Extrato Bruto; MF é a massa da fração e MTEB é a massa total do extrato bruto. Com relação as massas utilizadas nas fases (MFA), estas foram calculadas da seguinte fórmula  $MFA = [(((CEB*6)*MF(FMeOH))/MTEB*1,2)*MFase] / MTFMeOH$ , onde CEB é a concentração do Extrato Bruto; MF(FMeOH) é a massa da fração metanólica; MTEB é a massa total do extrato bruto (Tabela 1).

Cada uma das dietas preparadas conforme descrito acima foram colocadas em placas de Petri (2,0 g) e oferecidas as formigas por um período de 24 horas. Após esse período tais dietas foram trocadas por dieta artificial, composta de glicose, bacto-peptona, extrato de levedura, ágar e água destilada (100 mL) (BUENO et al., 1997). Após a adição da água, a dieta artificial foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos e ao final, foram vertidas em placas de Petri. Pedacos de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  desta dieta foram oferecidos as formigas durante todo o período de avaliação.

A mortalidade foi avaliada nas operárias de tamanho médio no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º, 13º, 15º, 17º, 19º e 21º dias depois do oferecimento das dietas impregnadas com as frações e fases de *C. floribundus*. Todos os experimentos foram mantidos em câmara climatizada com temperatura de  $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de 70%. Os dados foram submetidos a análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Realizou-se ainda o teste de contraste para verificar semelhança entre os tratamentos, criando-se



grupos de efeitos semelhantes ( $\chi^2$ ;  $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005) e do pacote estatístico Survival (THERNEAU, 2011).

Tabela 1 Massa das frações e fases obtidas a partir do extrato bruto metanólico de *Zanthoxylum pohlianum*, rendimento das frações ou fase em relação ao extrato bruto e massa total utilizada para avaliar a atividade formicida contra *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em testes via ingestão

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa da Fração (MF) (g)</b>	<b>Massa das Fases (MFA)</b>	<b>Rendimento da Fração/Fase em relação a MTEB/MTFMeOH (%)</b>	<b>Concentração do Extrato Bruto (MEB) (mg)</b>	<b>Massa total utilizada (g)</b>
Fração Hexano (FH)	23,86	-	22,72	200	0,32
				400	0,65
				600	0,98
Fração Acetato etila (FAE)	2,22	-	2,11	200	0,03
				400	0,06
				600	0,09
Fração Metanólica (FMeOH)	65,81	-	62,68	200	0,90
				400	1,80
				600	2,70
<b>Resíduo das Frações (RF)</b>	1,24	-	1,18	200	0,01
				400	0,03
				600	0,05

“Tabela 1, conclusão”

<b>Tratamentos</b>	<b>Massa da Fração (MF) (g)</b>	<b>Massa das Fases (MFA)</b>	<b>Rendimento da Fração/Fase em relação a MTEB/MTFMeOH (%)</b>	<b>Concentração do Extrato Bruto (MEB) (mg)</b>	<b>Massa total utilizada (g)</b>
Fase Aquosa (FA)	-	4,26	71,00	200	0,63
				400	1,27
				600	1,91
Fase Orgânica (FO)	-	0,47	7,83	200	0,07
				400	0,14
				600	0,21
Resíduo das Fases (RF)	-	0,54	9,00	200	0,08
				400	0,16
				600	0,24

\*Massa total do Extrato Bruto (MTEB) = 104,98 g; \*\*Massa total da FMeOH (MTFMeOH) =6g

### 2.4.2 Teste fungicida

O fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (estirpe FF2006) foi isolado de um único ninho de formigas cortadeiras de *Atta sexdens* e mantido pelo Laboratório de Microbiologia da Unesp/Rio Claro. Como previamente descrito por Pagnocca et al.(1990, 1996) a composição do meio de cultura usado para a manutenção da cultura e dos experimentos foi peptona 5,0 g, cloreto de sódio 5,0 g, extrato de malte 10,0 g, glicose 10 g, Agar-agar 10 g L<sup>-1</sup> e aveia 50 g de aveia bruta. O meio de cultura realizado foi autoclavado a 120 °C e 1 atmosfera, durante 20 minutos, e vertido em placas de Petri dentro do fluxo laminar, previamente esterelizado com luz ultravioleta. O fungo simbiote que serviu de inóculo cresceu em meio de cultura estéril por aproximadamente um mês, sendo o mesmo mantido em sala climatizada (26 °C).

Os extratos brutos e as frações utilizadas nos experimentos foram previamente solubilizados em 1000 µL e 500 µL de DMSO, respectivamente. Para que a mistura fosse homogênea utilizou-se tubos tipo falconautoclavados (50 mL). Nestes tubos foi colocado o meio de cultura (50 mL), em temperatura de aproximadamente 30 °C, e adicionou-se o extrato vegetal solubilizado na concentração desejada, conforme Tabela 1. Os tubos falcon foram agitados vigorosamente e depois se adicionou 10 mL do meio de cultura por placa de Petri. Nas placas que serviram de inóculo foram realizados halos de 0,5 cm de diâmetro e transferidos para as placas de Petri de plástico (60×15 mm) contendo o meio de cultura autoclavado + os tratamentos que foram empregados. Desta forma, os tratamentos avaliados consistiram além dos já citados na tabela, de mais duas testemunhas, uma continha apenas o meio de cultura Pagnocca et al. (1990) e a outra, o meio de cultura + 500 µL ou 1000 µL. O experimento foi inteiramente casualizado e utilizou-se 5 repetições por tratamento. Os tratamentos foram mantidos em sala climatizada (26 °C) por 30 dias.

As placas de Petri foram escaneadas utilizando o scanner Genius, modelo Color Page-HR7X Slim e o programa Presto Page Manager (1997-2001) New Soft Technology Corporation. Para mensurar o crescimento fúngico macroscopicamente, as placas foram escaneadas durante quatro semanas, com intervalos de sete dias. Para realizar as análises estatísticas utilizaram-se as avaliações do 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias.

Para avaliar os possíveis efeitos sobre *L. gongylophorus*, a eficiência do crescimento (G) foi estimada, dividindo a média final do diâmetro da colônia (DF) pela média do diâmetro inicial (DI), conforme indicado na fórmula  $G=DF/DI$ . Então, o crescimento relativo de *L. gongylophorus* (CR), na presença de diferentes extratos foi expresso em relação a testemunha (G1):  $CR=G/G1$ . Assim, a porcentagem de inibição foi calculada com base no controle. Cada tratamento foi comparado com a testemunha DMSO 500  $\mu$ L ou 1000  $\mu$ L. As diferenças entre os tratamentos foram analisados por meio do teste de F (ANOVA), nível de significância de 0,05%, sendo utilizado para isso o programa Bioestat, versão 5.0 (AYRES et al., 2007). Para as observações sob microscópio, uma placa de cada tratamento foi escolhida aleatoriamente, logo após a última avaliação. Pequenos pedaços fúngicos foram removidos assepticamente com agulhas destas placas e colocadas em uma lâmina a qual continha uma gota de ácido láctico (~3-4 $\mu$ L) segundo protocolo mencionado por Crous et al. (2009) recomendado para realizar montagens semipermanentes. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico Leica ICC5 e foram fotografadas pelo programa Leica Application Suite Version 3.5.0.

Tabela 2 Concentração dos Extratos brutos, Frações e Fases de *Croton floribundus* e *Zanthoxylum pohlianum* utilizada nos testes fungicidas contra o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

Concentração/Plantas	<i>Z. pohlianum</i>	<i>C. floribundus</i>
1 mg.mL <sup>-1</sup>	Extrato bruto	Extrato bruto
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	Fração Hexano	Fração Hexano
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	-	Resíduo da Fração Hexano
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	Fração Acetato de Etila	Fração Acetato de Etila
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	-	Resíduo da Fração Acetato de Etila
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	Fração Metanólica	Fração Metanólica
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	Resíduo da Fração Metanólica	-
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	Fração Aquosa	Fração Aquosa
0, 3 mg.mL <sup>-1</sup>	Fração Orgânica	Fração Orgânica

As placas dos tratamentos utilizados no experimento anterior, exceto aquelas em que foi recolhido material fúngico para a confecção das lâminas, serviram de inóculo para esta nova etapa. Realizaram-se halos de 0,5 cm de diâmetro nestas placas e estes foram transferidos para placas de Petri de plástico (60×15 mm) contendo o meio de cultura autoclavado, da mesma forma que descrito anteriormente. Foram utilizadas seis repetições para cada tratamento. O fungo *L. gongylophorus* cresceu durante 30 dias em sala climatizada (26 °C). Para mensurar o crescimento fúngico macroscopicamente, as placas foram escaneadas durante quatro semanas, com intervalos de sete dias. Para realizar as análises estatísticas utilizaram-se as avaliações do 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias. Após a última avaliação, as placas dos tratamentos foram utilizadas para o recolhimento de

material fúngico, o qual foi realizado lâminas e analisadas microscopicamente. As análises estatísticas e o procedimento para a confecção das lâminas foram realizados conforme descrito anteriormente.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Teste formicida

A fração metanólica de *Zanthoxylum pohlianum* dentre todas as frações testadas foi aquela que apresentou elevado potencial formicida. A concentração intermediária ( $400 \text{ mg.g}^{-1}$ ) exibiu comportamento semelhante a testemunha com ingrediente ativo sulfluramida 0,3%. A mortalidade foi baixa em 24 horas (11,35%) e elevada após 21 dias de avaliação (94,26%),  $TL_{50}=5,4$  dias. Já a concentração mais baixa ( $200 \text{ mg.g}^{-1}$ ) apresentou o mesmo comportamento da testemunha sem ingrediente ativo, baixa mortalidade em 24 horas (2,80%) e após 21 dias (49,11%),  $TL_{50}=21$  dias. Para a maior concentração avaliada ( $600 \text{ mg.g}^{-1}$ ), a mortalidade foi baixa em 24 horas (5,15%) e elevada após 21 dias (71,47%),  $TL_{50}=12$  dias (Tabela 3, Figura 1). Devido a fração metanólica apresentar potencial formicida, realizou-se o procedimento de partição líquido-líquido, o qual gerou duas fases: orgânica e aquosa. Realizaram-se testes preliminares e a fase aquosa apresentou elevado potencial formicida.



Tabela 3 Concentração, Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) \*, Valores de  $\alpha$  e  $\beta^{**}$ , e Mortalidade Acumulada (%) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas a bioensaios de ingestão utilizando as frações solúveis em hexano, acetato de etila e metanol de *Zanthoxylum pohlianum*, e as fases orgânica, aquosa e resíduo obtidas a partir da fração metanólica

Tratamento	Concentração mg g <sup>-1</sup>	TL <sub>50</sub>	Valor de á	Valor de â	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
						24 h	21 dias
Sulfluramida	0,3%	15	1,67	18,99	0,01e-16	0,75	70,45
Testemunha	-	>21	1,67	39,36	4,89e-16	0,22	30,29
Fração Hexano	200	>21	1,67	39,36	4,89e-16	0,22	30,29
	400	>21	1,67	39,36	4,89e-16	0,22	30,29
	600	>21	1,67	39,36	4,89e-16	0,22	30,29
Sulfluramida	0,3%	13,5	2,32	16,44	0,01e-16	0,41	80,50
Testemunha	-	>21	2,32	28,19	1,50e-10	0,12	37,72
Fração Acetato de Etila	200	20,8	2,32	21,56	3,90e-08	0,18	50,86
	400	20,8	2,32	21,56	3,90e-08	0,18	50,86
	600	20,8	2,32	21,56	3,90e-08	0,18	50,86
Sulfluramida	0,3%	5,4	1,04	7,65	5,35e-02	11,35	94,26
Testemunha	-	21	1,04	30,62	4,30e-05	2,80	49,11
Fração Metanólica	200	21	1,04	30,62	7,23e-16	2,80	49,11
	400	5,4	1,04	7,65	8,35e-02	11,35	94,26

“Tabela 3, conclusão”

Tratamento	Concentração mg g <sup>-1</sup>	TL <sub>50</sub>	Valor de á	Valor de â	P-valor	Mortalidade Acumulada (%)	
						24 h	21 dias
	600	12	1,04	16,89	6,57 e-07	5,15	71,47
Sulfluramida	0,3%	13,2	1,47	6,22	9,11e-13	2,18	72,84
Testemunha	-	>21	1,47	13,97	2,40e-15	0,70	34,00
Resíduo das	200	>21	1,47	13,97	2,40e-15	0,70	34,00
Frações	400	>21	1,47	13,97	2,40e-15	0,70	34,00
	600	>21	1,47	13,97	2,40e-15	0,70	34,00

\*Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) é o tempo necessário de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste; \*\*α= parâmetro de forma e β parâmetro de escala.

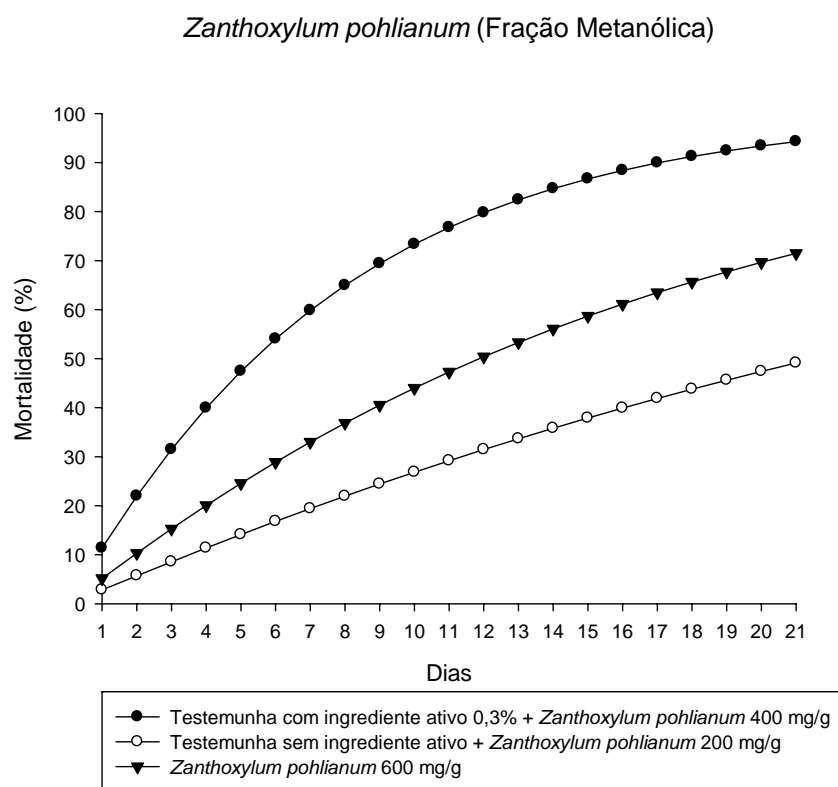


Figura 1 Toxicidade da fração metanólica de *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae) oferecido via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A fração hexano, acetato e o resíduo das frações não apresentaram atividade formicida. Na fração hexano, a curva de mortalidade das concentrações testadas (200, 400 e 600 mg.g<sup>-1</sup>) foi semelhante a testemunha sem ingrediente ativo. A mortalidade foi de 0,22% após 24 horas de exposição a pasta e de 30,29% após 21 dias de pós-ingestão, TL<sub>50</sub>>21 dias. Estes tratamentos diferiram da testemunha com ingrediente ativo sulfluramida, o qual apresentou

mortalidade de 0,75% após 24 horas e 70,45% após 21 dias,  $TL_{50}=15$  dias (Tabela 3, Figura 2).

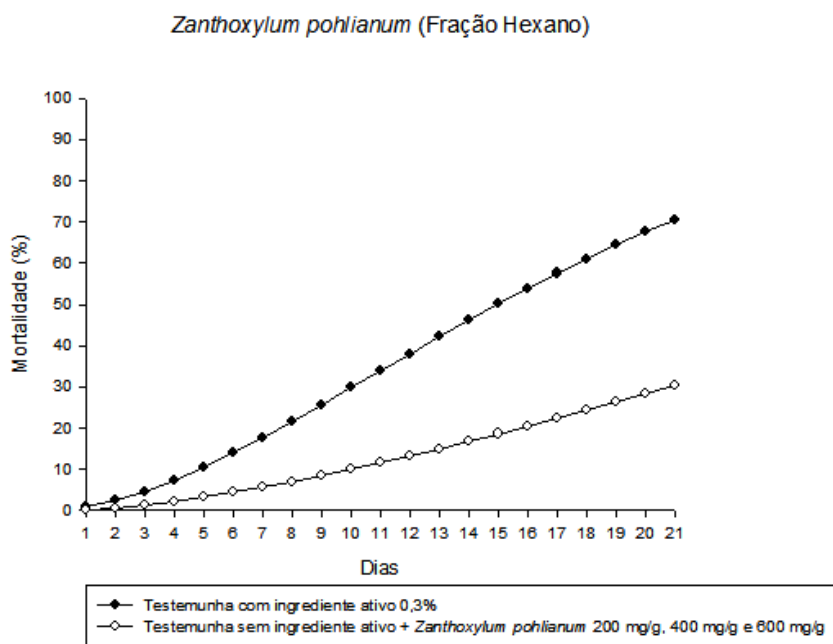


Figura 2 Toxicidade da fração hexano de *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae) oferecidos via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A fração acetato apresentou três curvas de mortalidade distintas, na primeira curva de se refere a testemunha sem ingrediente ativo, a qual ocasionou baixa mortalidade em 24 horas (0,12%) e após 21 dias de avaliação (37,72%),  $TL_{50}>21$  dias. Já a segunda curva de mortalidade, observou-se grupos congêneres entre as concentrações de 200, 400 e 600 mg.g<sup>-1</sup>, a mortalidade variou entre 0,18% após 24 horas e 50,86% após 21 dias,  $TL_{50}=20,8$  dias. A terceira curva de mortalidade se refere a testemunha com ingrediente ativo

sulfluramida 0,3%. A mortalidade neste tratamento foi baixa em 24 após o oferecimento da pasta (0,41%) e elevada após 21 dias de avaliação (80,50%),  $TL_{50}$ =13,5 dias (Tabela 3, Figura 3).

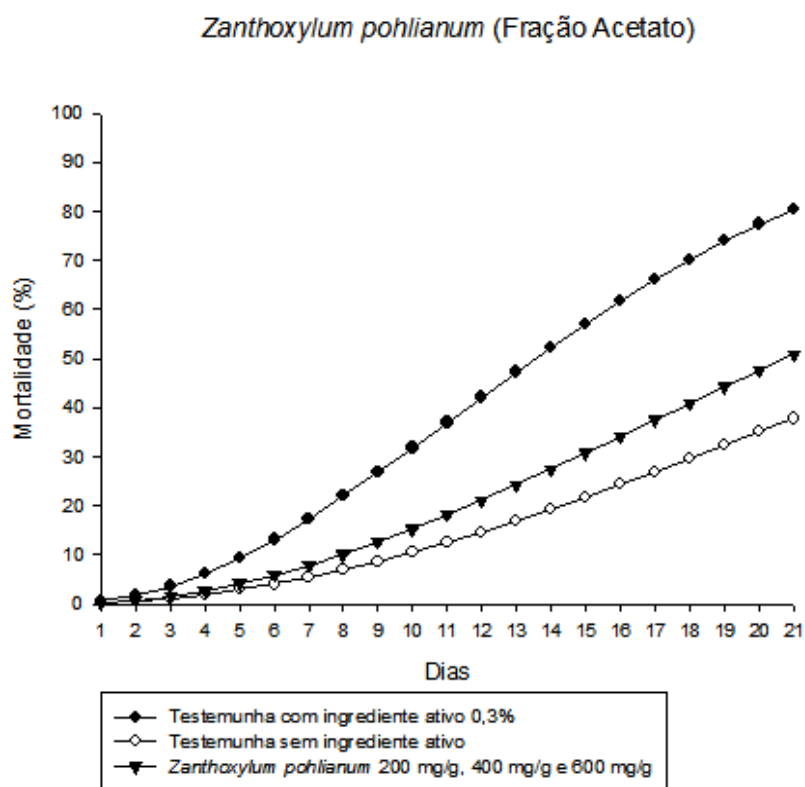


Figura 3 Toxicidade da fração acetato etila de *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae) oferecidos via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

O resíduo das frações apresentou duas curvas distintas. Na primeira curva de mortalidade observa-se que a testemunha sem ingrediente ativo e as concentrações testadas (200, 400 e 600 mg.g<sup>-1</sup>) apresentaram o mesmo padrão de

comportamento. A mortalidade foi baixa em 24 horas (0,70%) e após 21 dias de avaliação (34%),  $TL_{50} > 21$  dias. Já a segunda curva se refere a testemunha com ingrediente ativo sulfluramida 0,3%. Neste tratamento a mortalidade variou entre 2,18% em 24 horas e 72,84% após 21 dias de avaliação (Tabela 3, Figura 4).

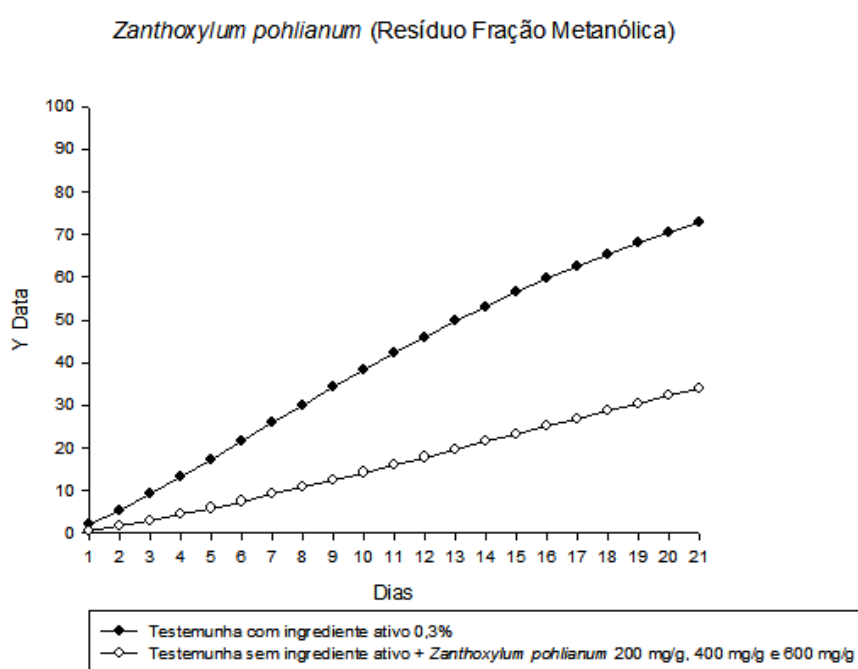


Figura 4 Toxicidade da fração acetato etila de *Zanthoxylum pohlianum* (Rutaceae) oferecidos via ingestão para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em três concentrações: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

### 3.2 Teste fungicida

O crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus* em meio de cultura sem solvente não apresentou diferença significativa a testemunha com solvente DMSO 1000  $\mu\text{L}$  ( $F_{1,6}=1,23$ ;  $p=0,30$ ). As diferenças entre os tratamentos foram observadas nas lâminas de microscopia, em que a testemunha sem solvente apresentou formação de gongilídeos (Figura 5A) e a outra não, apenas hifas (Figura 5B).

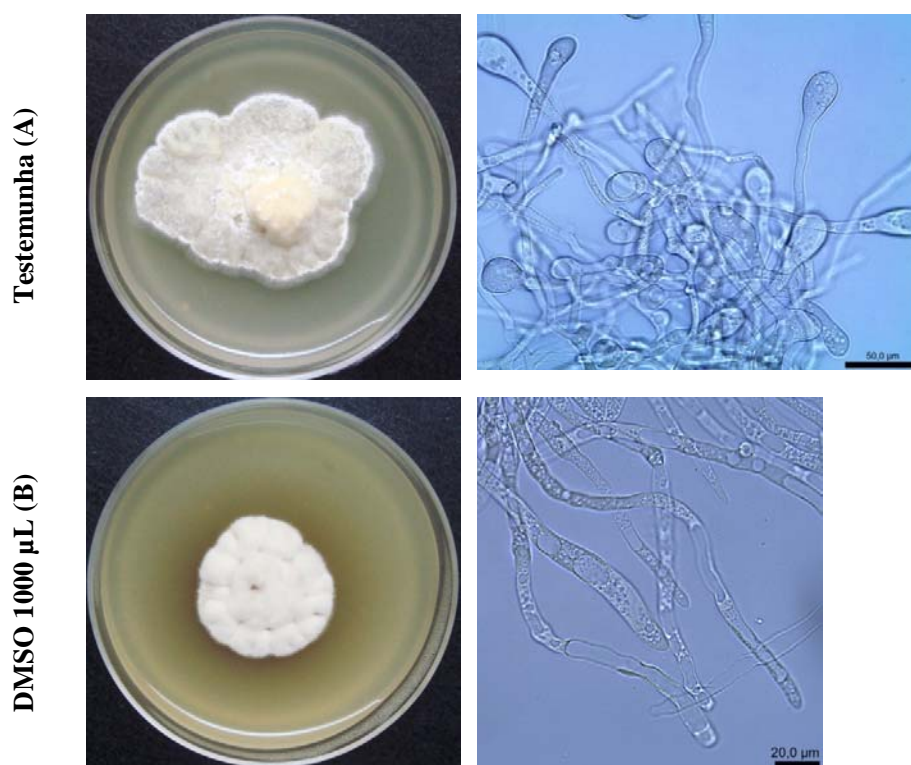


Figura 5 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbiote. (A) Testemunha sem solvente; (B) DMSO 1000  $\mu\text{L}$

O extrato bruto metanólico de *C. floribundus* apresentou crescimento fúngico reduzido em 40% se comparado a testemunha com solvente DMSO 1000  $\mu\text{L}$  ( $F_{1,5}=15,97$ ,  $p=0,01$ ) (Figura 6A, Tabela 4). O crescimento fúngico no substrato contendo o extrato bruto metanólico de *Z. pohlianum* não foi significativamente diferente da testemunha com este solvente ( $F_{1,6}= 4,15$ ,  $p=0,08$ ) (Figura 6B).

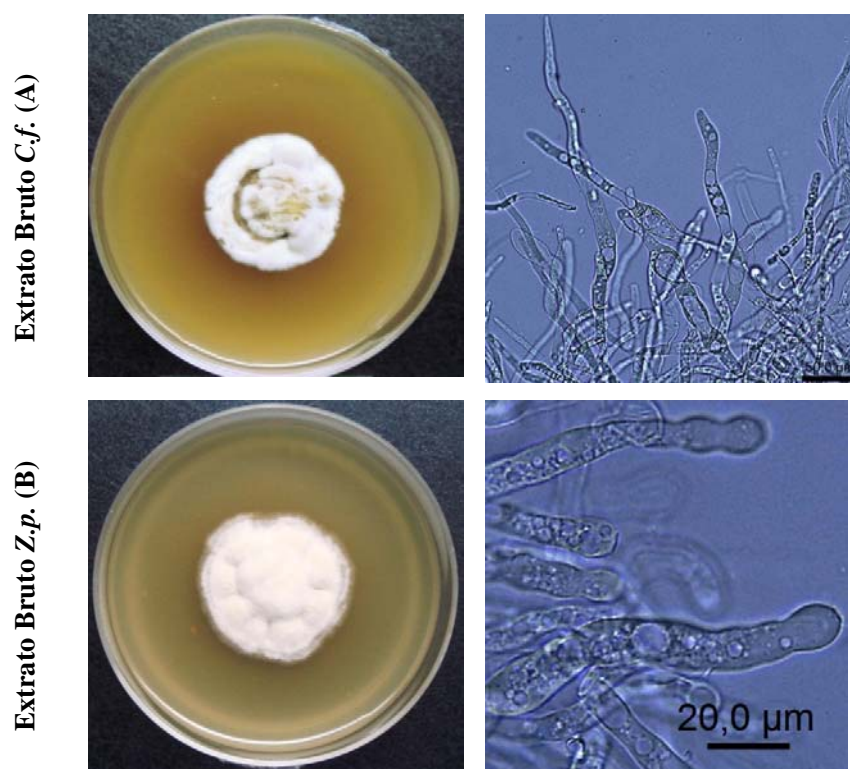


Figura 6 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Extrato Bruto *Croton floribundus* (C.f.) ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e (B) Extrato Bruto *Zanthoxylum pohlianum* (Z.p.) ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ )



Tabela 4 Crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* na presença de extratos brutos e frações de *Zanthoxylum pohlianum* (*Z.p.*) e *Croton floribundus* (*C.f.*) (Média em cm  $\pm$  Erro Padrão)

Tratamentos	Diâmetro Inicial da Colônia (DI)	Diâmetro Final da Colônia (DF)	G <sup>+</sup>	CR <sup>++</sup>	(%) de Inibição $\phi$
Testemunha DMSO 1000 $\mu$ L	0,10 $\pm$ 0,002	0,67 $\pm$ 0,013	0,56	1,00	0
Extrato bruto <i>Z.p.</i>	0,15 $\pm$ 0,006	0,78 $\pm$ 0,018	0,63 <sup>ns</sup>	1,12	-12
Extrato bruto <i>C.f.</i>	0,13 $\pm$ 0,006	0,47 $\pm$ 0,050	0,34*	0,60	40
Testemunha DMSO 500 $\mu$ L	0,16 $\pm$ 0,008	0,72 $\pm$ 0,116	0,56	1,00	0
Fração Hexano <i>C.f.</i>	0,16 $\pm$ 0,009	0,84 $\pm$ 0,083	0,68 <sup>ns</sup>	1,21	-21
Resíduo da Fração Hexano <i>C.f.</i>	0,14 $\pm$ 0,009	0,65 $\pm$ 0,024	0,50 <sup>ns</sup>	0,89	11
Fração Acetato de Etila <i>C.f.</i>	0,15 $\pm$ 0,003	0,74 $\pm$ 0,110	0,59 <sup>ns</sup>	1,05	-5
Resíduo da Fração Acetato <i>C.f.</i>	0,16 $\pm$ 0,012	0,94 $\pm$ 0,164	0,78 <sup>ns</sup>	1,39	-39
Fração Metanólica <i>C.f.</i>	0,17 $\pm$ 0,012	1,16 $\pm$ 0,075	0,99*	1,76	-76
Fração Aquosa <i>C.f.</i>	0,15 $\pm$ 0,012	1,68 $\pm$ 0,413	1,53*	2,73	-173
Fração Orgânica <i>C.f.</i>	0,15 $\pm$ 0,002	0,73 $\pm$ 0,055	0,57 <sup>ns</sup>	1,01	-1
Fração Hexano <i>Z.p.</i>	0,18 $\pm$ 0,005	0,95 $\pm$ 0,037	0,77 <sup>ns</sup>	1,37	-37

“Tabela 4, conclusão”

Tratamentos	Diâmetro Inicial da Colônia (DI)	Diâmetro Final da Colônia (DF)	G <sup>+</sup>	CR <sup>++</sup>	(%) de Inibição φ
Fração Acetato de Etila <i>Z.p.</i>	0,17 ± 0,004	1,06±0,063	0,88*	1,57	-57
Fração Metanólica <i>Z.p.</i>	0,17 ± 0,005	0,80±0,069	0,63 <sup>ns</sup>	1,12	-12
Continuação da tabela 4					
Tratamentos	Diâmetro Inicial da Colônia (DI)	Diâmetro Final da Colônia (DF)	G <sup>+</sup>	CR <sup>++</sup>	(%) de Inibição φ
Fase Aquosa <i>Z.p.</i>	0,17 ± 0,010	1,15±2,162	0,97*	0,41	-73
Fase Orgânica <i>Z.p.</i>	0,15 ± 0,006	0,64±0,067	0,48 <sup>ns</sup>	0,85	15

+G: Eficiência do crescimento (DF-DI); ++CR: Crescimento relativo baseado nas colônias controle (G1): CR=G/G1; \*Médias dos tratamentos que diferem significativamente da testemunha DMSO 500 µL ou 1000 µL pelo Teste F (ANOVA), p <0,05); φ Expressos em percentagem em relação ao controle; crescimento negativo > que o crescimento da testemunha, crescimento positivo < crescimento da testemunha.

O crescimento fúngico ou micelial da testemunha sem solvente foi semelhante ao da testemunha com solvente DMSO 500  $\mu$ L ( $F_{1,8}=1,04$ ;  $p=0,33$ ). A fração metanólica de *C. floribundus* ( $F_{1,8}=10,60$ ;  $p=0,01$ ) (Figura 7B) e sua fase aquosa ( $F_{1,8}=5,07$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 7C) diferiram significativamente da testemunha DMSO 500  $\mu$ L (Figura 7A) (Tabela 4). Estas por sua vez, potencializaram o crescimento fúngico em 76 e 173%, respectivamente. No entanto, a testemunha com DMSO 500  $\mu$ L e a fração metanólica de *C. floribundus* não apresentaram a formação de gongílideos, enquanto na fase aquosa foi observada sua formação.

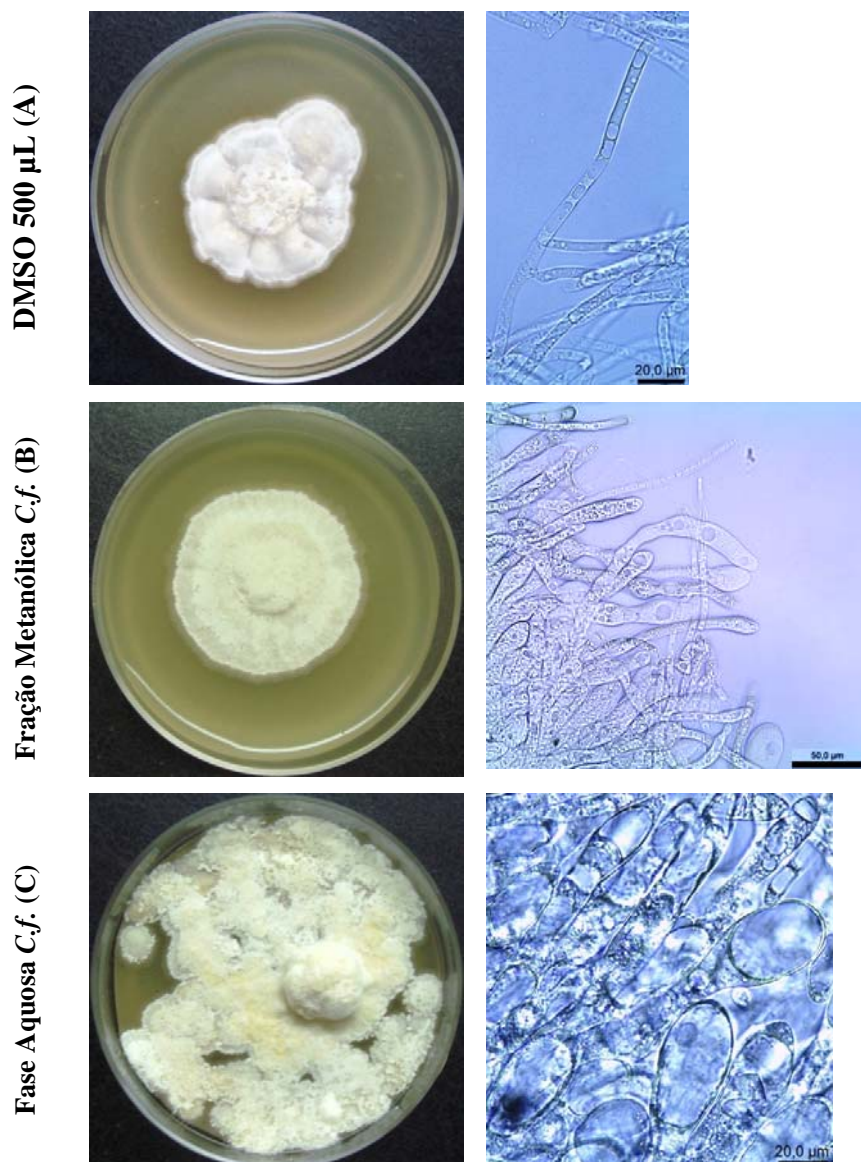


Figura 7 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Testemunha DMSO 500  $\mu$ L; (B) Fração Metanólica de *C. floribundus* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) e (C) Fração Aquosa de *C. floribundus* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>).

A fração acetato de etila ( $F_{1,8}=5,88$ ,  $p=0,04$ ) e a fase aquosa de *Z. pohlianum* ( $F_{1,7}=8,06$ ;  $p=0,02$ ) também apresentaram crescimento diferenciado da testemunha com DMSO 500  $\mu\text{L}$  (Tabela 4). Estas estimularam o crescimento do fungo *L. gongylophorus* em 57% e 73%, respectivamente, porém nestes tratamentos não foi evidenciado a formação de gongilídeos (Figuras 8A e 8B).

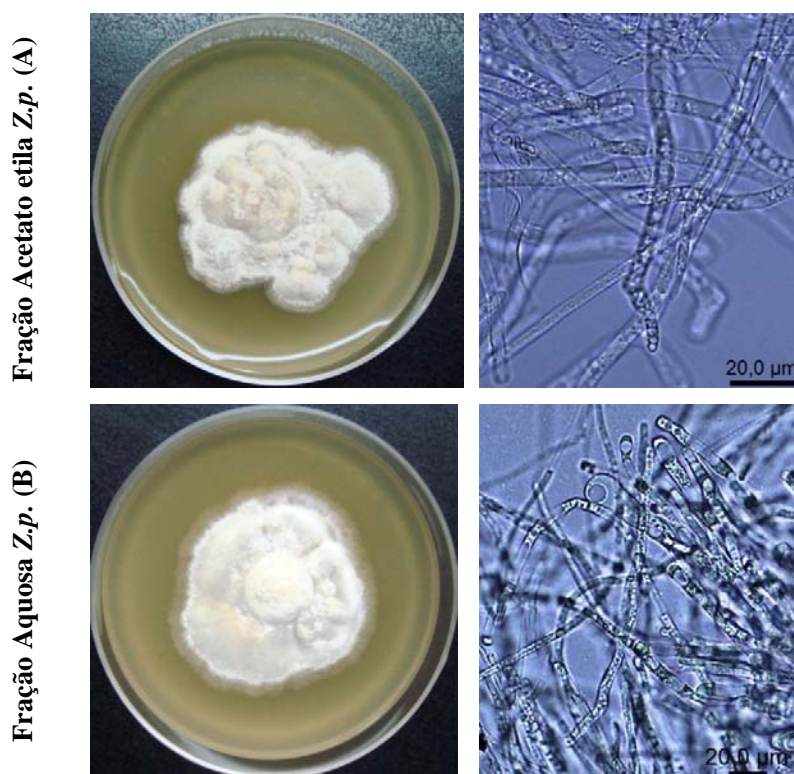


Figura 8 Fotos do crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbiote. (A) Fração Metanólica de *Z. pohlianum* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e (B) Fração Aquosa de *Z. pohlianum* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ )

A fração hexano ( $F_{1,8}=0,76$ ,  $p=0,58$ ) (Figura 9A), o resíduo da fração hexano ( $F_{1,7}=0,17$ ,  $p=0,69$ ) (Figura 9B), a fração acetato de etila ( $F_{1,8}=0,03$ ,  $p=0,85$ ) (Figura 9C), o resíduo da fração acetato etila ( $F_{1,7}=0,17$ ,  $p=0,29$ ) (Figura 10A) e a fase orgânica de *C. floribundus* ( $F_{1,8}=0,007$ ,  $p=0,93$ ) (Figura 10B) não apresentaram diferença significativa no crescimento de *L. gongylophorus* se comparado a testemunha DMSO 500  $\mu$ L. No entanto, a fase orgânica de *C. floribundus* apresentou formação de gongilídeos. Além destes tratamentos, a fração hexano ( $F_{1,8}= 3,17$ ,  $p=0,11$ ) (Figura 10C), a fração metanólica ( $F_{1,8}=0,27$ ,  $p=0,61$ ) (Figura 11A) e a fase orgânica de *Z. pohlianum* ( $F_{1,8}=0,34$ ,  $p=0,58$ ) (Figura 11B) também foram semelhantes a testemunha com solvente.

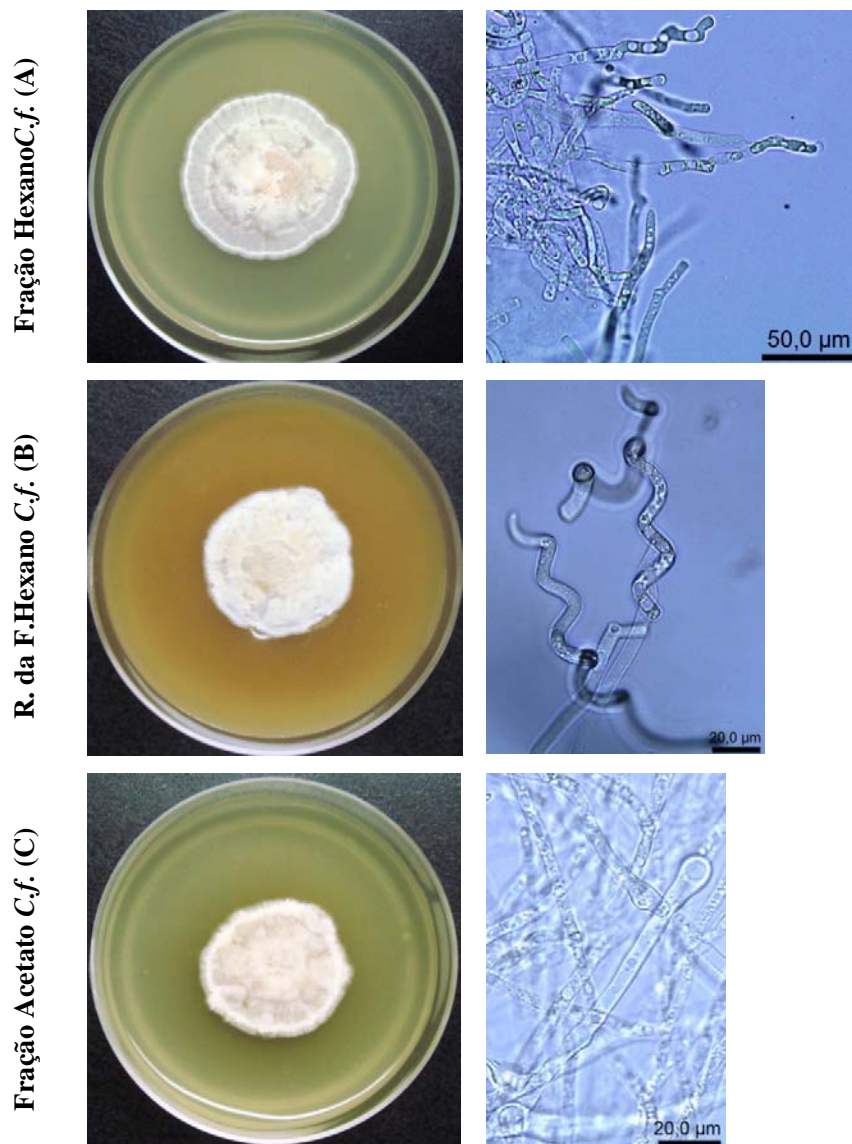


Figura 9 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Fração Hexano C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Resíduo da Fração Hexano C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (C) Fração Acetato etila C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ )

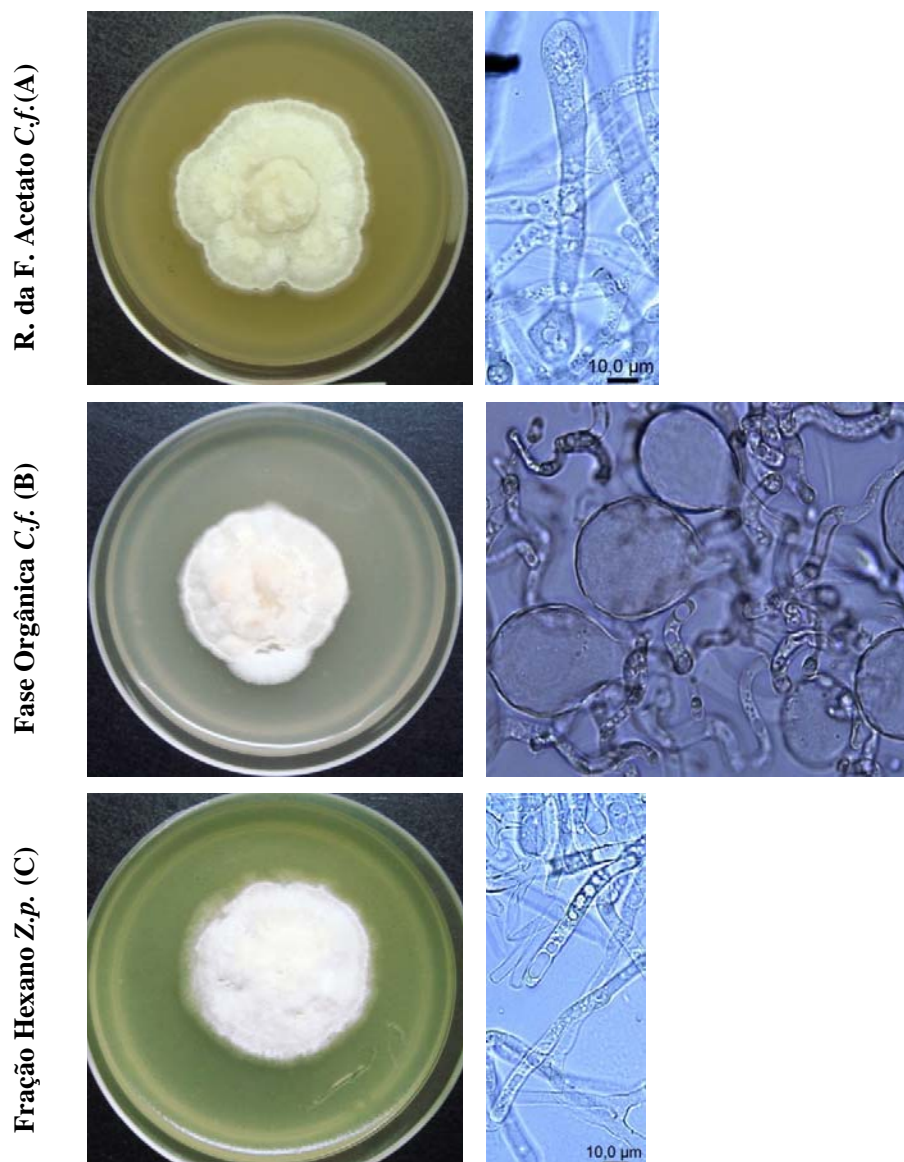


Figura 10 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbiote. (A) Resíduo da Fração Acetato C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Fase Orgânica C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (C) Fração Hexano Z.p. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ )



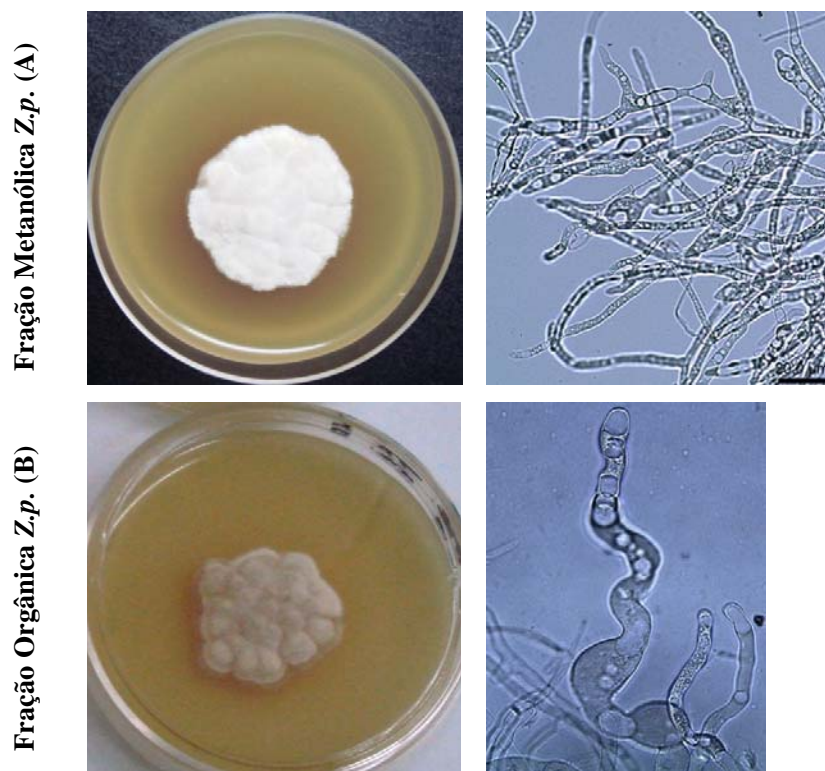


Figura 11 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbiote. (A) Fração Metanólica *Z.p.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Fração Orgânica *Z.p.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

A testemunha sem solvente e a testemunha com solvente DMSO 1000  $\mu\text{L}$  não apresentaram diferença significativa ( $F_{1,9}=1,07$ ,  $p=0,32$ ) (Figura 12A e 12B). As diferenças observadas foram na morfologia do fungo simbionte, a qual pode ser visto macroscopicamente em placas e também em lâminas. A morfologia do fungo simbionte com DMSO 1000  $\mu\text{L}$  já havia sido alterada na primeira repicagem, quando se sucedeu a segunda repicagem, parte do fungo produziu gongilídeo (Figura 12B). Na parte cotonosa do desenvolvimento do fungo simbionte foi observado apenas a formação de hifas.

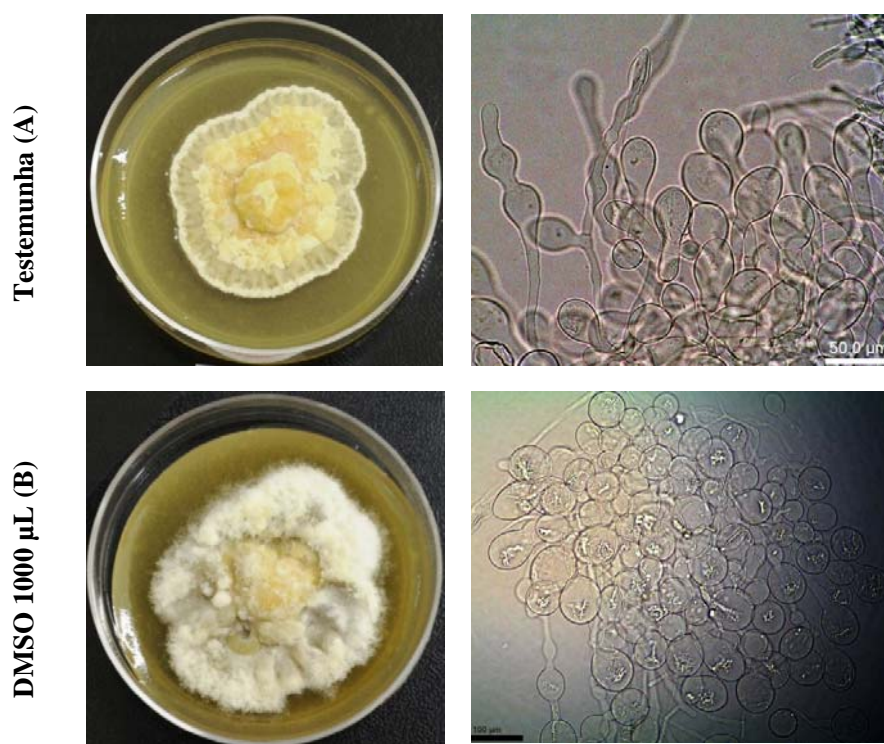


Figura 12 Fotos do crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes substratos, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: lâmina das hifas do fungo simbionte. (A) Testemunha sem solvente; (B) DMSO 1000  $\mu\text{L}$

A testemunha com o solvente DMSO 1000  $\mu$ L também não apresentou diferença significativa no crescimento de *L. gongylophorus* se comparado aos extratos brutos de *C. floribundus* ( $F_{1,8}=2,6$ ,  $p=0,13$ ) (Figura 13A) e *Z. pohlianium* (Figura 13B) ( $F_{1,9}=2,6$ ,  $p=0,13$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 Crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* repicado em meio de cultura após ter crescido na presença do meio de cultura com os extratos brutos ou frações de *Zanthoxylum pohlianium* (*Z.p.*) e *Croton floribundus* (*C.f.*) (Média em cm  $\pm$ Erro Padrão)

Tratamentos	Diâmetro Inicial da Colônia (DI)	Diâmetro Final da Colônia (DF)	G+
Testemunha DMSO 1000 $\mu$ L	0,37 $\pm$ 0,021	1,69 $\pm$ 0,070	1,32*
Extrato bruto <i>Z.p.</i>	0,33 $\pm$ 0,020	1,19 $\pm$ 0,062	0,86
Extrato bruto <i>C.f.</i>	0,30 $\pm$ 0,017	1,24 $\pm$ 0,082	0,94
Testemunha DMSO 500 $\mu$ L	0,29 $\pm$ 0,025	1,39 $\pm$ 0,100	1,10
Fração Hexano <i>C.f.</i>	0,32 $\pm$ 0,010	1,09 $\pm$ 0,082	0,77
Resíduo da Fração Hexano <i>C.f.</i>	0,33 $\pm$ 0,011	1,86 $\pm$ 0,076	1,53
Fração Acetato de Etila <i>C.f.</i>	0,37 $\pm$ 0,015	0,95 $\pm$ 0,115	0,58
Fração Metanólica <i>C.f.</i>	0,21 $\pm$ 0,007	1,85 $\pm$ 0,166	1,64
Fração Aquosa <i>C.f.</i>	0,37 $\pm$ 0,013	1,49 $\pm$ 0,108	1,12
Fração Orgânica <i>C.f.</i>	0,40 $\pm$ 0,029	1,14 $\pm$ 0,154	0,74
Fração Hexano <i>Z.p.</i>	0,24 $\pm$ 0,006	0,97 $\pm$ 0,090	0,73
Fração Acetato de Etila <i>Z.p.</i>	0,30 $\pm$ 0,014	1,24 $\pm$ 0,120	0,94
Fração Metanólica <i>Z.p.</i>	0,34 $\pm$ 0,01	1,33 $\pm$ 0,096	0,99
Fase Orgânica <i>Z.p.</i>	0,33 $\pm$ 0,013	0,94 $\pm$ 0,163	0,61

+G: Eficiência do crescimento (DF-DI); \*Todas as Médias dos tratamentos da coluna não apresentam diferença significativa da testemunha DMSO 500  $\mu$ L ou 1000  $\mu$ L pelo Teste F (ANOVA),  $p < 0,05$ ; Resíduo da Fração Acetato *Z.p.* e Fração Aquosa *Z.p.* resultados não apresentados.

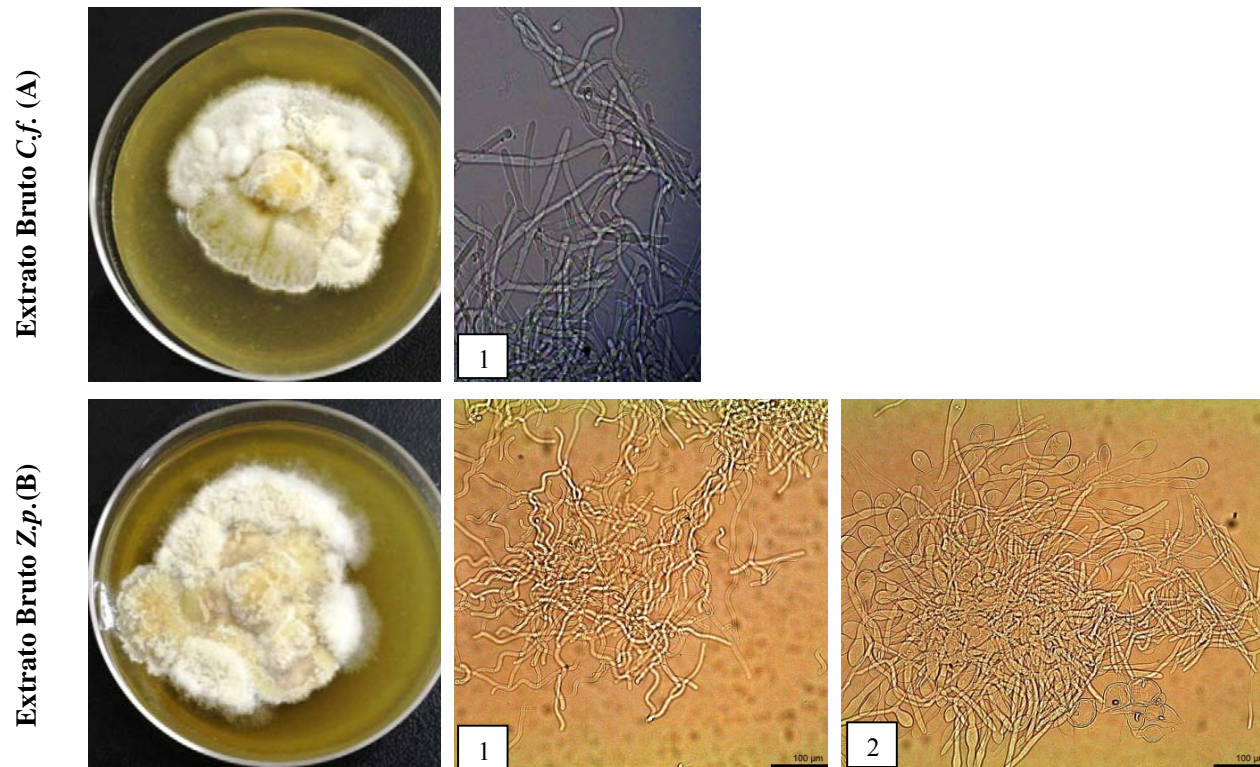


Figura 13 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) Extrato Bruto de *Croton floribundus* ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Extrato Bruto de *Zanthoxylum pohlianum* ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

A testemunha sem solvente não diferiu significativamente da testemunha com DMSO 500  $\mu$ L ( $F_{1,9}=0,016$ ,  $p=0,89$ ). O crescimento fúngico da testemunha com solvente DMSO 500  $\mu$ L (Figura 14A) e os demais tratamentos avaliados foram semelhantes: fração hexano de *Croton floribundus* (C.f.) ( $F_{1,8}= 1,22$ ;  $p=0,30$ ) (Figura 14B), resíduo da fração hexano C.f. ( $F_{1,8}=2,22$ ;  $p=0,17$ ) (Figura 15A), fração acetato etila C.f. ( $F_{1,8}=1,97$ ;  $p=0,19$ ) (Figura 15B), fração metanólica C.f. ( $F_{1,9}=1,2$ ;  $p=0,30$ ) (Figura 16A), fração aquosa C.f. ( $F_{1,9}=0,0013$ ;  $p=0,97$ ) (Figura 16B), fração orgânica C.f. ( $F_{1,7}=0,95$ ;  $p=0,63$ ) (Figura 17A), fração hexano *Zanthoxylum pohlianum* (Z.p.) ( $F_{1,8}=1,29$ ;  $p=0,28$ ) (Figura 17B), fração acetato etila Z.p. ( $F_{1,8}=0,18$ ;  $p=0,67$ ) (Figura 18A), fração metanólica Z.p. ( $F_{1,9}=0,10$ ;  $p=0,75$ ) (Figura 18B), fração orgânica Z.p. ( $F_{1,7}=1,4$ ,  $p=0,26$ ) (Figura 19B) (Tabela 5).

A morfologia do fungo simbiote *L. gongylophorus* apresentou-se alterada na primeira repicagem utilizando como substrato o DMSO (500 e 1000  $\mu$ L), e os extratos brutos, frações e fases dos extratos vegetais de *C. floribundus* e *Z. pohlianum*. Observou-se que a maioria dos tratamentos não apresentava gongilídeos. Já na segunda repicagem, em que se utilizou como substrato apenas o meio de cultura foi possível observar uma reativação do fungo, embora ainda fosse possível constatar alterações em sua morfologia. A fração hexano (Figura 14B) e a fase orgânica (Figura 17A) de *C. floribundus*, e a fração acetato etila (Figura 18A) e fase aquosa (Figura 19A) de *Z. pohlianum* não apresentaram formação de gongilídeos. Isso demonstra que estes substratos utilizados no meio de cultura interferiram de tal forma em sua morfologia, que quando repicados somente em meio de cultura, os mesmos não formaram gongilídeos, apresentaram atividade fungistática em sua produção.

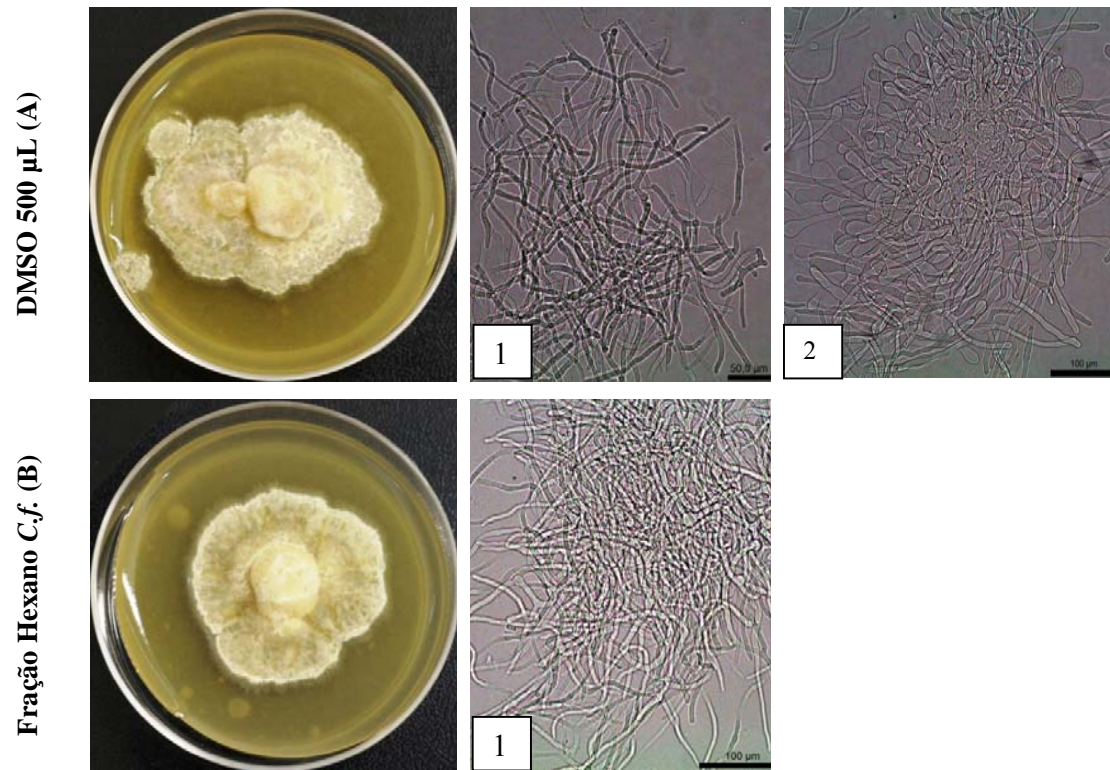


Figura 14 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) DMSO 500  $\mu$ L; (B) Fração hexano *Croton floribundus* (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>).

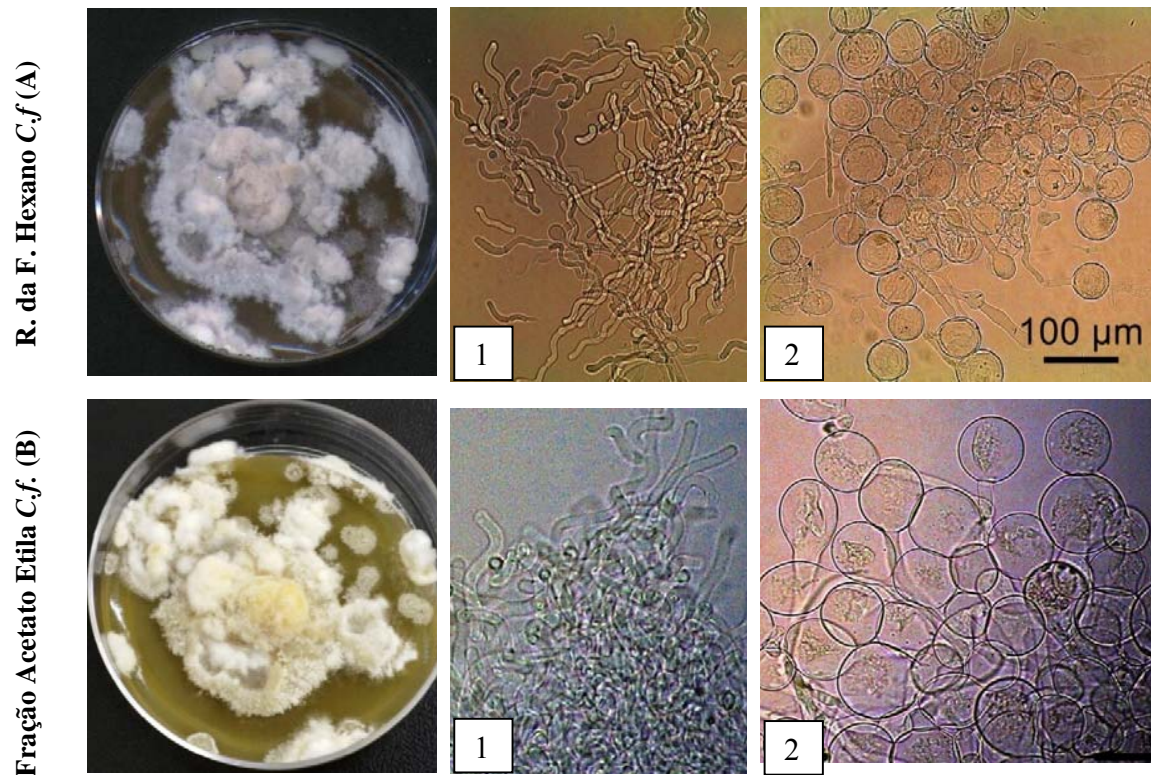
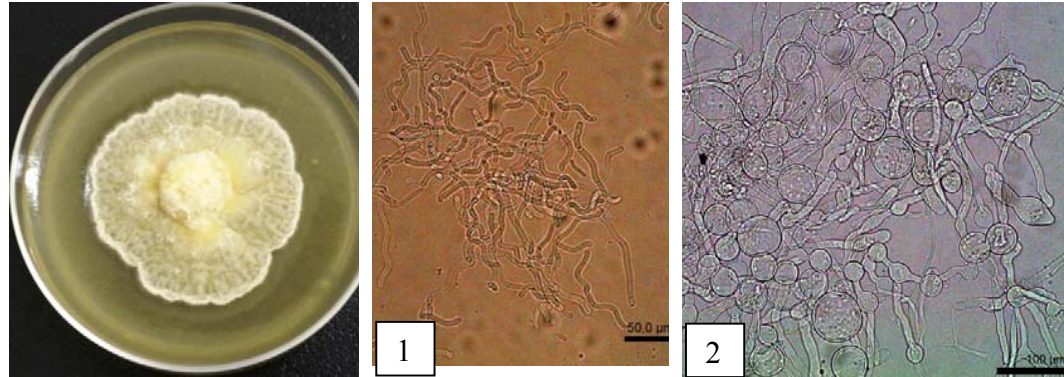


Figura 15 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) Resíduo da Fração hexano C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ );(B) Fração acetato etila C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Fração Metanólica *C.f.* (A)



Fração Aquosa *C.f.* (B)

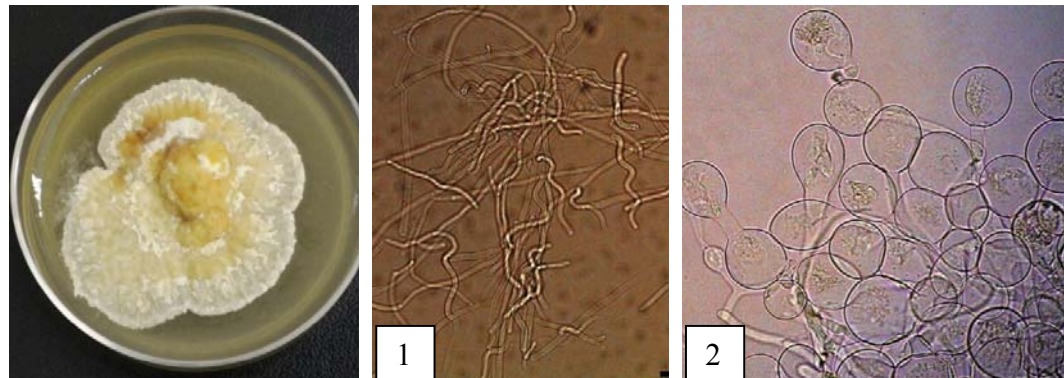


Figura 16 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) Fração Metanólica *C.f.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Fração aquosa *C.f.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).



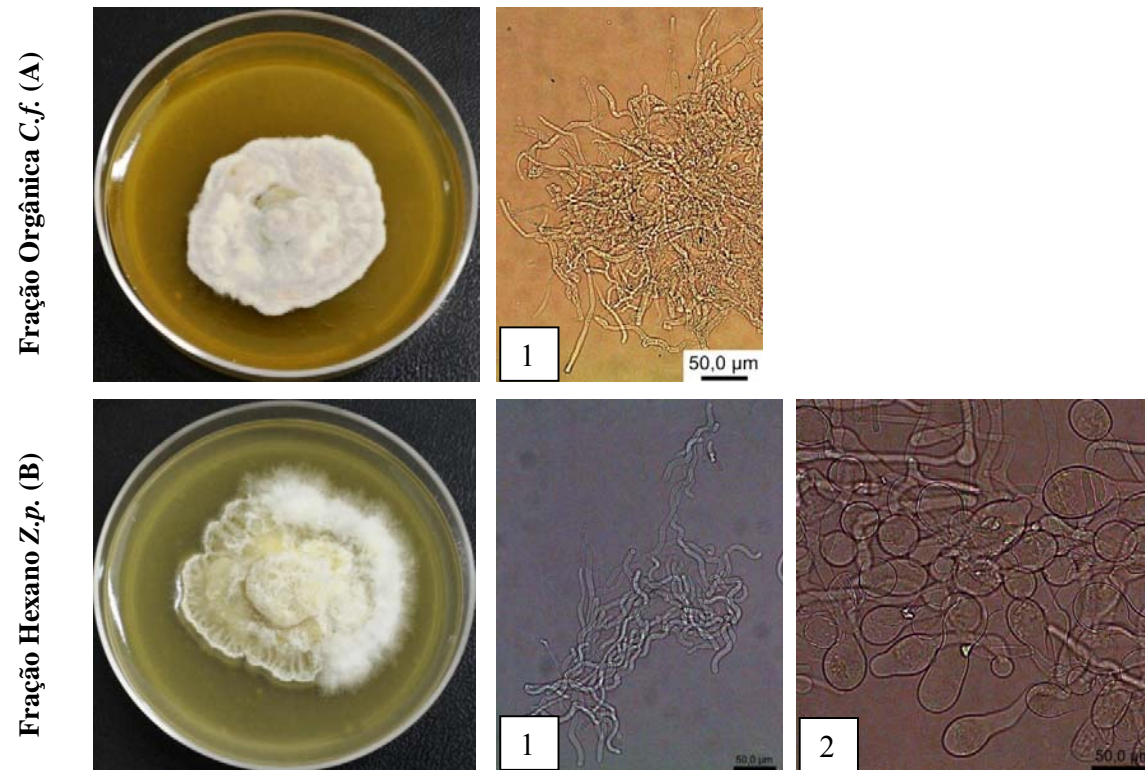
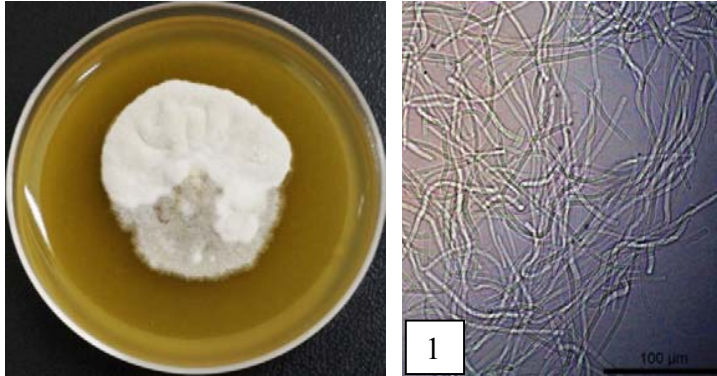


Figura 17 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) Fase orgânica C.f. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Fração hexano Z.p. ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Fração Acetato Etila *Z.p.* (A)



Fração Metanólica *Z.p.* (B)

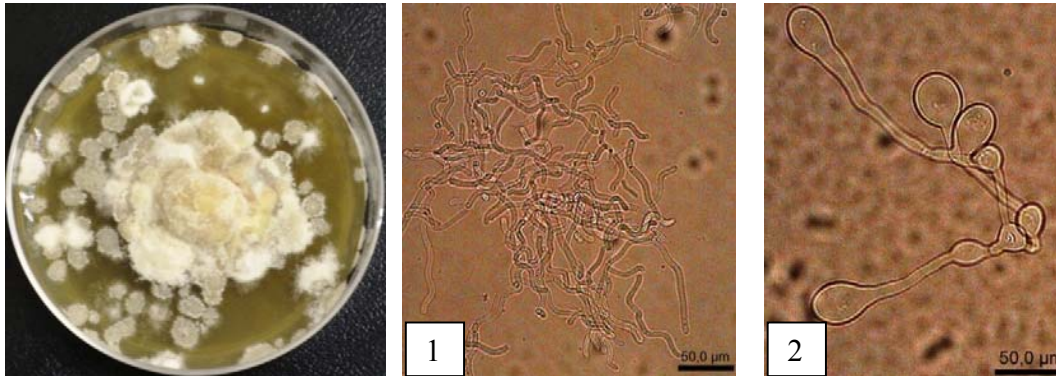


Figura 18 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura, lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) Fração acetato etila *Z.p.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Fração metanólica *Z.p.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

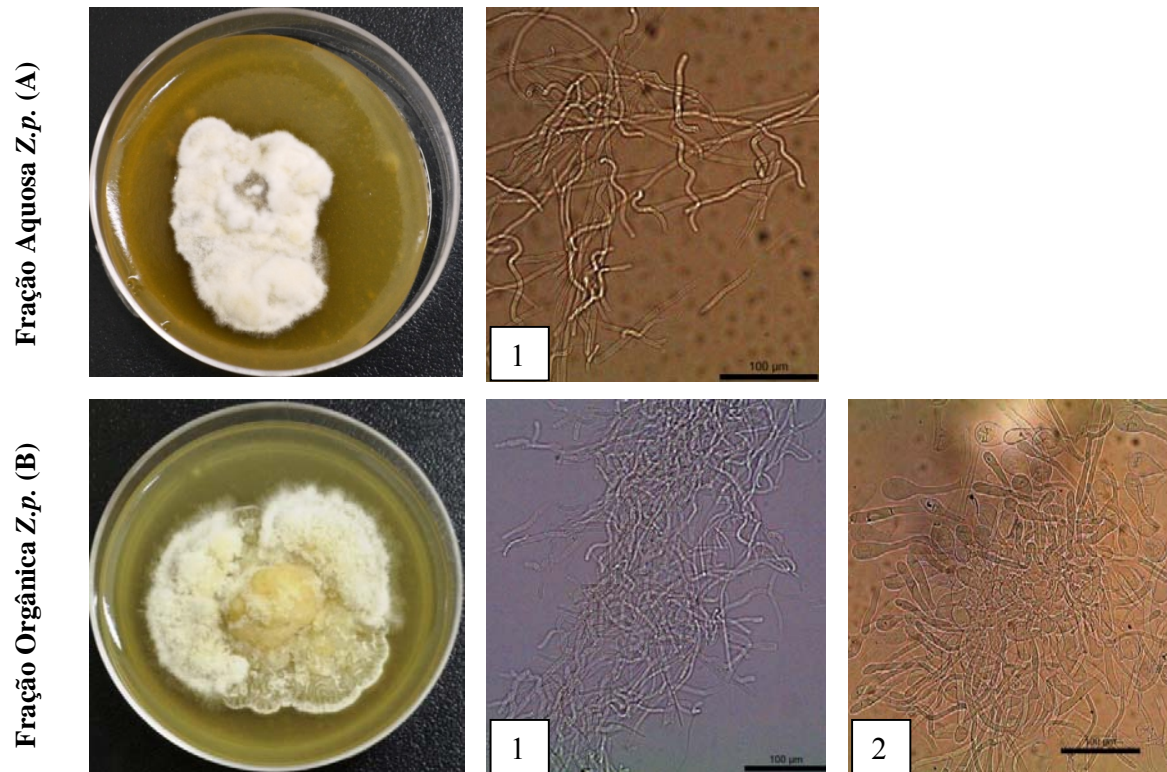


Figura 19 Crescimento fúngico de *Leucoagaricus gongylophorus* em meio de cultura , lado esquerdo: crescimento em placa, lado direito: (1) lâmina das hifas do fungo simbiote, (2) lâmina dos gongilídeos

Nota: (A) Fração aquosa *Z.p.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ); (B) Fração orgânica *Z.p.* ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

A fração metanólica de extratos brutos metanólicos de *Zanthoxylum pohlianum* e a sua fase aquosa apresentaram ação formicida. Extratos brutos ou frações polares de outras plantas pertencentes a família Rutaceae já foram relatadas com atividade formicida (ALMEIDA et al., 2007; TERESAN et al., 2010). A ação tóxica de *Z. pohlianum* as operárias de *A. sexdens* não havia sido relatada na literatura. No entanto, outras espécies do gênero *Zanthoxylum* tais como, *Z. schinifolium*; e *Z. piperitum* e *Z. armatum* apresentaram atividade inseticida contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) Motsch. E *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae), respectivamente (HIEU; KIM; AHN, 2012; WANG et al., 2011).

A atividade formicida de *Z. pohlianum* está provavelmente relacionada com a presença de metabólitos secundários desta planta. Assim, faz-se necessário a determinação das substâncias envolvidas na ação tóxica para que possam ser testas em iscas para a aplicação em condição de campo. Estudos químicos já foram realizados e através da extração de óleo essencial das folhas de *Z. monoginum* (sinonímia de *Z. pohlianum*) (THE PLANT LIST, 2013), identificou-se por cromatografia gasosa (CG) e de massas (CG-MS) vários compostos. Dentre eles, limoneno, acetato de citronelilo, citronelol, citronelal e 2-undecanona, sendo estes dois últimos compostos majoritários (MAIA; ANDRADE, 2007). A atividade de citronelal e outros compostos isolados de *Z. piperitum* (cuminaldehide, acetato geranil, álcool cuminil, linalol, limoneno) foram repelentes a fêmeas de *Aedes aegypti* L. (KNOW et al., 2011). Em estudos com os extratos brutos metanólicos de *Z. schinifolium* e suas substâncias isoladas (schinifoline e skimmianine) apresentaram atividade de deterrência alimentar contra *Tribolium castaneum* Herbst e *Sitophilus zeamais* (LIU; CHU; JIANG, 2009).

A atividade de repelência a insetos causada por citrônella e citrônello já são bastante conhecidas (CORRÊA; SALGADO, 2011; MAIA; PARENTE JUNIOR, 2008; NERIO; VERBEL; STASHENKO, 2010). Em nossos experimentos foi possível observar que as formigas após a aplicação da pasta dos diferentes tratamentos exibem algumas características comportamentais, as quais já foram relatadas por Brugger et al. (2008). Após a aplicação, as formigas se aproximam do tratamento e tateiam, e dependendo do composto, logo após a antenação estas se afastam rapidamente, locomovendo-se no sentido ântero-posterior. As operárias quando expostas a um novo substrato exibem um comportamento exploratório com provável função de reconhecimento e o rápido afastamento das mesmas pode ser um indicativo de repelência ou ineditismo frente a novos substratos (BRUGGER et al., 2008). Nos experimentos foi possível observar que as formigas cortavam o papel alumínio, o qual servia de base para a pasta oferecida e recobria a mesma, como um possível sinal de repelência ao substrato oferecido. Tal fato pode ser o fator determinante para a baixa mortalidade de alguns tratamentos.

A fração metanólica desencadeou comportamento semelhante ao inseticida comercial sulfluramida a 0,3%, ou seja, mortalidade baixa após 24 horas e elevada após 21 dias da aplicação. O inseticida ideal para uma formulação formicida deve ser letal em baixa concentração, agir por ingestão e ter ação retardada, de modo a ser disperso por trofilaxia e “grooming” para a maioria das operárias da colônia (ETHERIDGE; PHILLIPS, 1976; NAGAMOTO et al., 2004; VERZA et al., 2006).

Com relação a atividade de *Z. pohlianum* sobre o fungo simbiote foi possível observar que o conjunto meio de cultura e fração acetato etila ou fase aquosa estimularam o crescimento fúngico. No entanto, estes compostos interferiram na formação de gongilídeos, os quais não foram possíveis serem observados em lâminas sugerindo uma possível atividade fungistática para esta

estrutura. Em nenhum momento observou-se atividade fungicida, embora na literatura seja relatada essa atividade para várias espécies do gênero *Zanthoxylum* (BAFI-YEBOA et al., 2005; GONG et al., 2009; NGANE et al., 2000; PRIETO et al., 2011). O crescimento do fungo simbiote pode estar relacionado com uma maior quantidade de polissacarídeos disponíveis nestas frações. Segundo Siqueira et al. (1998), o amido e a xilana, polissacarídeos presentes nas plantas utilizadas como substrato para o cultivo do fungo *L. gongylophorus*, são rapidamente consumidos por sua vegetação. O fungo pode eficientemente hidrolizar estes polissacarídeos e assimilar a xilose, maltose e glicose resultante (SIQUEIRA et al., 1998) e potencializar seu crescimento.

Os gongilídeos são estruturas especializadas produzidas pelo fungo simbiote *L. gongylophorus* para a alimentação das larvas, que apesar de estarem em constante contato com o fungo, não são capazes de se alimentar sozinhas, sendo estas dependentes das operárias (BUENO et al., 2008). Os gongilídeos podem estar espalhados por todo o fungo de jardim e quando observados em microscópio, visualmente observa-se as hifas com as extremidades infladas, arredondadas e o agrupamento destas estruturas são chamados de estáfilas. As estáfilas são ricas em lipídeos e carboidratos, enquanto as hifas são ricas em proteínas (QUILAN; CHERRETT, 1977). Em nossos experimentos observou-se apenas formação de hifas, porém sem gongilídeos. Na literatura há relatos que as formigas cortadeiras de *Atta sexdens* são incapazes de utilizar proteínas hidrolizadas como base alimentar (SILVA et al., 2003) e as operárias apresentam menor longevidade quando alimentadas com hifas (BASS; CHERRETT, 1995).

O extrato bruto metanólico de *C. floribundus* reduziu parcialmente o crescimento do fungo simbiote. Não há relatos na literatura sobre atividade fungicida de *C. floribundus*, apenas atividade antimicrobiana de outras espécies do gênero *Croton* sp. (OKOKON; NWAFOR, 2010; SILVA JUNIOR et al.,

2009). Os terpenóides (ácido ent-caur-16-en-19-óico; 2-candol B; 3-6-hidróxi caur-16-en-19-ol; 4-16-hidróxi-19-cauranoato de metila; 5-ácido 16 $\alpha$ , 17-diidróxi -19-cauranóico) e esteróide (sitosterol glicosilado) são os principais compostos presentes em *C. floribundus* (PEIXOTO, 2003). O ácido caurenóico é o único composto em que já se tem relato de atividade fungicida (COTORAS; FOLCH; MENDOZA, 2004; PADLA; SOLIS; RAGASA, 2012). Os compostos presentes nestas plantas podem ter inibidos parcialmente o crescimento fúngico, ter apresentado atividade fungistática na formação de gongilídeos, fato ocorrido na fração hexano e fase orgânica ou ter estimulado o crescimento fúngico e a produção destas estruturas como ocorrido na fração metanólica e aquosa de *C. floribundus*, respectivamente.

A fração metanólica de *C. floribundus* e sua fase aquosa potencializaram o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. Além disso, a fase aquosa estimulou a produção de gongilídeos. Tal fato torna-se importante devido ao crescimento lento deste fungo em laboratório (BORBA et al., 2006). Desta forma, encontrar uma substância isolada ou um conjunto de substâncias que proporcione um melhor crescimento deste fungo pode favorecer futuros estudos em torno do seu comportamento. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o fungo parasita *Escovopsis* sp.e outros fungos simbiotes presentes nessa microbiota visando desestabilizar o equilíbrio existente e ocasionar a mortalidade de *L. gongylophorus* (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012; REYNOLDS; CURRIE, 2004). Vale ressaltar que a fração metanólica e a fase aquosa de *C. floribundus* foram testadas e estas apresentaram ação formicida. Existe a possibilidade de futuros estudos, cultivando o fungo *L. gongylophorus* nestes substratos e oferecer as formigas visando verificar se as substâncias ativas presentes nestas frações possam estar concentradas nos gongilídeos, e quando alimentadas verificar a longevidade das mesmas.

## 5 CONCLUSÃO

A fração metanólica de *Z. pohlianum* apresentou atividade formicida sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa* em testes *in vitro* via ingestão; A fração acetato de etila e a fração aquosa de *Z. pohlianum* estimularam o crescimento do fungo simbiote. No entanto, não observou a produção de gongilídeos. A fração aquosa de *C. floribundus* estimulou o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* e estimulou a produção de gongilídeos.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. A. et al. Toxicity of substances isolated from *Helieta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2007.
- AYRES, M. et al. **Bioestat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Versão 5.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; MCT-CNPq, 2007. 324 p.
- BAFI-YEBOA, N.F.A. et al. Antifungal constituents of Northern prickly ash, *Zanthoxylum americanum* Mill. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, n. 5, p. 370-377, 2005.
- BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.
- BIAVATTI, M. W. et al. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and x-ray structure of flindersiamine. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 66-70, 2002.
- \_\_\_\_\_. Leaf-cutting ants toxicity of limononic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata* x-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, 2005.
- BIGI, M. F. M. A. et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.
- BOARETTO, M.A.; FORTI, L.C. **Perspectivas no controle de formigas cortadeiras**. Disponível em: <<http://www.uesb.br/entomologia/cortadeiras.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2011.
- BORBA, R. da S. et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n. 3, p. 725-730, maio/jun. 2006.

BRUGGER, M. S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de extratos hexânicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1958) (Formicidae, Attini). **Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 3, p. 233-238, 2008.

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**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

\_\_\_\_\_. Utilização de alimento pelas formigas cortadeiras. In: VILELA, E.F. et al. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2008. p.19-38.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 beta-hydroxy-kaurenoic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, n.10, p. 2821-2826, Oct. 2004.

CROUS, P.W. et al. **Fungal biodiversity**. Utrecht: CBS-KNAW, 2009.269p.

ETHERIDGE, P.; PHILLIPS, F.T. Laboratory evaluation of new insecticides and bait matrices for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 66, p. 569-578, 1976.

GONG, Y.W. et al. Chemical composition and antifungal activity of the fruit oil *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae) from China. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 21, n. 2, p. 174-178, 2009.

HIEU, T.T.; KIM, S.I.; AHN, Y.J. Toxicity of *Zanthoxylum piperitum* and *Zanthoxylum armatum* oil constituents and related compounds to *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 49, n. 5, p. 1084-1091, 2012.

KNOW, H.W. et al. Enhanced repellency of binary mixtures of *Zanthoxylum armatum* seed oil, vanillin, and their aerosols to mosquitoes under laboratory and field conditions. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 48, n. 1, p.61-66, 2011.

LIU, Z. L.; CHU, S. S.; JIANG, G. H. Feeding deterrents from *Zanthoxylum schinifolium* against two stored-products insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 21, p. 10130-10133, Nov. 2009.

MAIA, C.S.; PARENTE JÚNIOR, W.C. Citronela, aliada natural para repelir pernilingos. **Norte Científico**, Boa Vista, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2008.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A. Leaf essential oil composition of *Zanthoxylum monogynum* St.- Hil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Dehradun, v. 10, n. 4, p. 282-286, 2007.

NAGAMOTO, N. S. et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 413-431, 2004.

NERIO, L.S.; VERBEL, J.O.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 1, p. 372-379, 2010.

NGANE, N.A. et al. Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonian Rutaceae: *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 70, n. 3, p. 335-342, 2000.

OKOKO, J.E.; NWAFOR, P.A. Antimicrobial activity of root extract and crude fractions of *Croton zambesicus*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Lahore, v.23, n. 1, p. 114-118, 2010.

PADLA, E.P.; SOLIS, L.T.; RAGASA, C.Y. Antibacterial and antifungal properties of ent-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Beijing, v. 10, n. 6, p. 408-414, 2012.

PAGNOCCA, F.C. et al. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 7, p. 1325-1330, Mar. 1996.

\_\_\_\_\_. Toxicity of sesame extract to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v.80, n. 3, p. 349-352, Sept. 1990.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V.E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche: a Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2012, p. 1-99, Mar. 2012.

PEIXOTO, J. L. B. **Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Croton floribundus* (Euphorbiaceae)**. 2003. 88 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

PRIETO, J.A. et al. Chemical composition, insecticidal and antifungal activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. **Chilean Journal of Agricultural**, Santiago de Chile, v. 71, n. 1, p. 73-82, 2011.

QUILAN, R.J.;CHERRETT, J.M.The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, London, v. 2, n. 2, p. 161-170, Mar. 1977.

R DEVELOPMENT CORE TEAM.**R**: a language and environment for statistical computing, reference index version 2.2.1. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2005. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 1 jan. 2010.

REYNOLDS, H.T.; CURRIE, C.R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus.**Mycologia**, New York, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources.**Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, Apr. 2003.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso cerrado.**Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1B, p. 242-248, 2009.

SIQUEIRA, C.G. de et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, Dec. 1998.

TEREZAN, A. P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus.**Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 882-886, Sept. 2010.

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species.** Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

THERNEAU, T. **Survival:** survival analysis, including penalised likelihood. R Package Version 2.35-8. Disponível em: <<http://r-forge.r-project.org>>. Acesso em: 15 out. 2011.

UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE. **Perfluorooctane Sulfonate (PFOS):** dossier prepared in support for a nomination of PFOS to the UN-ECE LRTAP Protocol and the Stockholm Convention. Disponível em: <<http://www.4buku.com/perfluorooctane-sulfonate-pfos-unece-pdf.html>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **The 9 new POPs.** Stockholm, 2010. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Implementation/NewPOPs/Publications/tabid/695/Default.aspx>>. Acesso em: 5 jul. 2011.

VERZA, S.S. et al. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 391-399, 2006.

WANG, C. F. et al. Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits leaves. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 4, p. 3077-3088, Apr. 2011.