

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo  
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios  
Instituto Biológico  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no  
Agronegócio**

**Toxicidade de fungicidas ao fungo simbiote de *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:  
FORMICIDAE) e alterações na colônia frente a aplicação dos produtos em  
diferentes formulações, em condições de laboratório.**

**Gabriele Luciana Saqui Medeiros**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em  
Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.  
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo  
2018

**Gabriele Luciana Saqui Medeiros**

**Toxicidade de fungicidas ao fungo simbiote de *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e alterações na colônia frente a aplicação dos produtos em diferentes formulações, em condições de laboratório.**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos

Co-Orientador: Dr. Odair Correa Bueno

São Paulo  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Medeiros, Gabriele Luciana Saqui.

Toxicidade de fungicidas ao fungo simbiote de *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e alterações na colônia frente a aplicação dos produtos em diferentes formulações, em condições de laboratório. / Gabriele Luciana Saqui Medeiros. - São Paulo, 2018.  
65 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ana Eugênia de Carvalho Campos.

Versão do título para o inglês: Toxicity of fungicides to symbiotic fungus of *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) and amendments in colony forward product application in different formulations in laboratory conditions.

1. Formigas cortadeiras 2. Controle 3. Fungicidas I. Medeiros, Gabriele Luciana Saqui II. Campos, Ana Eugênia de Carvalho III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

*IB/Bibl./2018/002*

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Gabriele Luciana Saqui Medeiros

Título: Toxicidade de fungicidas ao fungo simbionte de *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e alterações na colônia frente a aplicação dos produtos em diferentes formulações, em condições de laboratório.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico este trabalho a**  
José e Silvana, meu Pai e minha Mãe, por terem me  
proporcionado a oportunidade de estudar.  
Felipe, meu marido, por estar ao meu lado durante essa jornada me incentivando.  
Minhas irmãs, Michele e Daniele, meu sobrinho Gabriel e meus cunhados Luis Paulo e  
José Roberto.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Ana Eugênia, Orientadora, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela amizade e ensinamentos e por ser um exemplo de dedicação a pesquisa.

Ao Dr. Odair Correa Bueno, Co-orientador, pelo apoio, amizade e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho que me ajudaram na realização deste trabalho, Jeferson, Carolinne, Marcela e Larissa.

A equipe do laboratório do CEIS na UNESP que me auxiliaram na realização de alguns experimentos deste trabalho.

Aos meus colegas pós-graduandos pela amizade, risadas e momentos vividos durante essa jornada da pós-graduação.

.

MEDEIROS SAQUI, G.L. **Toxicidade de fungicidas ao fungo simbiote de *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e alterações na colônia frente a aplicação dos produtos em diferentes formulações, em condições de laboratório.** 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

## RESUMO

As formigas-cortadeiras são consideradas pragas por causarem diversos danos e prejuízos em diversas culturas agrícolas, por isso existe um grande interesse na descoberta de novos produtos e métodos que sejam eficientes no controle desses insetos. O objetivo deste trabalho foi selecionar fungicidas, em diferentes formulações, que sejam tóxicos ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e, verificar o comportamento das colônias de *Atta sexdens* após a aplicação dos produtos. O teste de toxicidade *in vitro* foi realizado em operárias de *Atta sexdens* para os fungicidas com potencial de controle; aplicação dos fungicidas, foi por meio de iscas formuladas e nebulização, em colônias de *Atta sexdens*, em condições de laboratório, e registrado as alterações comportamentais das colônias frente ao tipo de formulação. Os fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole mostraram ser potenciais para o controle do fungo simbiote das formigas-cortadeiras, apresentando 100% de inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo simbiote nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm. No teste de toxicidade *in vitro* em operárias, Piraclostrobina e Metconazole apresentaram efeito tóxico por ingestão das operárias na maior concentração avaliada (0,1%), nas demais concentrações avaliadas esse efeito não foi observado, assim como para o fungicida Epoxiconazole, que não foi tóxico para as operárias. A mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole apresentaram efeito tóxico por ingestão em formigas operárias de *Atta sexdens* nas concentrações 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 e 0,2%. No bioensaio de nebulização houve alteração na dinâmica das colônias logo após a aplicação dos fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, e mortalidade de um formigueiro em cada tratamento. No bioensaio de iscas contendo mistura de Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75% não apresentaram mortalidade e alterações na dinâmica das colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório. Portanto, os fungicidas avaliados, mesmo apresentando resultado satisfatórios em fungo isolado *L.*

*gongylophorus in vitro* e em operárias isoladas de *Atta sexdens*, mostraram não ser eficientes com aplicações de nebulização e iscas impregnadas em colônias mantidas em laboratórios tornando os mesmos inviáveis para utilização no controle da formiga cortadeira *Atta sexdens*.

**PALAVRAS-CHAVE:** formigas-cortadeiras, controle, fungicidas

MEDEIROS SAQUI, G.L. **Toxicity of fungicides to symbiotic fungus of *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) and amendments in colony forward product application in different formulations in laboratory conditions.** 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

## ABSTRACT

Leaf-cutting ants are considered pests because they cause damages in several agricultural crops, so there is a great interest in the discovery of new products and methods that are efficient in the control of these insects. The objective of this work was to select fungicides, in different formulations, that were toxic to the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* and to verify the behavior of the colonies of *Atta sexdens* after the application of the products. *In vitro* toxicity test was performed on *Atta sexdens* workers with fungicides with potential control. Application of fungicides with potential control, in the formulations of bait and fogging, in colonies of *Atta sexdens* under laboratory conditions, and record of the behavioral changes of the colonies versus the type of formulation, were also registered. The fungicides Piraclostrobin, Metconazol and Epoxiconazol showed potential for the control of the symbiotic fungus of the leaf-cutting ants, showing 100% inhibition of the mycelial growth of the fungus symbiont at the concentrations of 1, 10 and 100 ppm. In the *in vitro* toxicity test on workers, Piraclostrobin and Metconazol showed toxic effect by ingestion of the workers in the highest concentration evaluated (0.1%). In the other concentrations evaluated, this effect was not observed, as was the fungicide Epoxiconazole. The mixture of the fungicides Piraclostrobin + Metconazol showed toxic effect by ingestion on workers of *Atta sexdens* at the concentrations of 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 and 0.2%. In the fogging bioassay, there was a change in the dynamics of the colonies shortly after the application of the fungicides Piraclostrobin, Metconazol and Epoxiconazol in the concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0%, and mortality of one nest in each treatment. Bioassays of baits containing mixture of Piraclostrobin + Metconazol in the concentrations 0.1, 0.3, 0.5 and 0.75% did not present mortality and changes in the dynamics of the colonies of *Atta sexdens* kept in the laboratory. Therefore, the fungicides evaluated, even if they showed satisfactory results in *L. gongylophorus* isolated fungi *in vitro* and in isolated workers of *Atta sexdens*, were not efficient with

fogging applications and baits impregnated in colonies kept in laboratories, making them unviable for use in the control of leaf-cutting ants *Atta sexdens*.

**KEYWORDS:** leaf- cutting ants, control, fungicides

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1 Formigas-cortadeiras como pragas.....	5
3.2 Métodos de Controle de Formigas-cortadeiras.....	7
3.3 Controle do fungo mutualista <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	8
3.4 Fungicidas utilizados nos bioensaios.....	9
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
4.1 Obtenção de colônia pura do fungo.....	10
4.2 Seleção de fungicidas tóxicos ao fungo simbiote.....	12
4.3 Coleta de colônias de <i>Atta sexdens</i> e manutenção em laboratório.....	14
4.4 Bioensaios in vitro de toxicidade em operárias de <i>Atta sexdens</i> mantidas em laboratório.....	15
4.5 Dieta artificial para manutenção das formigas.....	15
4.6 Bioensaio de toxicidade.....	16
4.7 Análise de dados.....	18
4.8 Bioensaio de nebulização em colônias mantidas em laboratório.....	19
4.9 Bioensaio de iscas em colônias mantidas em laboratório.....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1 Crescimento micelial in vitro do fungo <i>L. gongylophorus</i> frente aos fungicidas avaliados.....	25
5.2 Bioensaio in vitro de toxicidade em operárias de <i>Atta sexdens</i> .....	29
5.3 Bioensaio de nebulização.....	33
5.4 Bioensaio com iscas impregnadas.....	42
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas pertencem à ordem Hymenoptera e a família Formicidae, são encontradas em quase todo o ambiente terrestre e são conhecidas por serem insetos de comportamento social bem complexo. As distintas espécies apresentam características próprias de comportamento e de morfologia (MARICONI, 1970). As sociedades das formigas são consideradas as mais complexas do reino animal. Algumas espécies formam colônias de até 300 milhões de indivíduos em um só ninho, onde cada indivíduo desempenha o seu papel específico na casta (CAETANO et al., 2002).

Estima-se que existam cerca de 24.000 espécies de formigas pertencentes a 23 subfamílias (BOLTON, et al., 2005; AGOSTI; JOHNSON, 2003), nos quais 15.411 (www.antiwiki.org) descritas (AGOSTI; JOHNSON, 2005; BRITTO et al., 2016). Existem cerca de 2.500 espécies no Brasil (BRANDÃO, 1991). Dentre as espécies encontradas no território brasileiro, apenas algumas dezenas são consideradas pragas (BUENO; CAMPOS-FARINHA, 1999).

Considerada um grupo monofilético, a tribo Attini compreende 45 gêneros, das quais 15 são representadas pelas formigas cultivadoras de fungos (WARD et al., 2015), dentre as quais destacam-se as formigas-cortadeiras, que utilizam folhas e flores frescas para o cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. As formigas-cortadeiras são encontradas apenas nas Américas, mas cobrindo uma ampla área geográfica, do norte da Argentina ao sul Estados Unidos. Dentro desta faixa, ocorrem em biomas mais diversos, por exemplo, a Floresta Amazônica e em ambientes extremos, tais como o deserto (SOLOMON et al., 2008; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; BRITTO et al., 2016).

Das 19 espécies do gênero *Atta* descritas, oito são encontradas no Brasil sendo quatro de grande importância agrícola para o Estado de São Paulo: *Atta sexdens*, *Atta capiguara*, *Atta laevigatta* e *Atta bisphaerica* (GALLO et al., 2002; OLIVEIRA, 2011). Estas espécies apresentam uma relação simbiótica com o fungo *L. gongylophorus*, dependendo dele como alimento para o desenvolvimento larval (CARLOS, 2008; WEBER, 1972; MARICONI, 1970; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As principais pragas agrícolas são as formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* (SOUZA-SILVA; ZANETTI, 2007). As colônias dessas formigas produzem indivíduos alados, machos e fêmeas, que se afastam de sua colônia original para formar novas colônias. A dispersão dos indivíduos sexuais ocorre pouco depois do início da

estação chuvosa e quente em diferentes regiões do país. Durante os meses de setembro a dezembro no Centro do Brasil, de setembro a abril no Norte, de dezembro a abril no Nordeste, e de junho a dezembro no Sul (FORTI; BOARETTO, 1997). As fêmeas aladas das saúvas são chamadas popularmente por “içás” ou “tanajuras”, e os machos são chamados por “bitus”. O voo de acasalamento ou voo nupcial ocorre quando fêmeas aladas e os machos voam e copulam no ar. Mais tarde, o macho morre e a fêmea, depois de ter sido fertilizada por 3-8 machos, aterrissa e perde suas asas, começando a escavar o novo ninho. A atividade de perfuração do solo para formar a nova colônia dura entre 6 a 10 horas (AUTUORI, 1942), com a construção de um túnel com uma profundidade variando de 8 a 25 cm e uma câmara inicial hemisférica (FORTI; BOARETTO, 1997; CAMARGO et al., 2011). Após a escavação, o canal é selado com solo escavado pela própria rainha. Antes do voo nupcial, a rainha leva consigo uma pequena porção do jardim de fungo da colônia original, e o aloja dentro de sua cavidade infrabucal. Após 48 horas, regurgita a porção de fungo, que, por sua vez, é cultivada com secreções e fezes até as primeiras operárias aparecem, num período de 80 a 100 dias. Logo depois disso, as operárias removem o solo que sela o estreito túnel e vai para fora para cortar plantas começando a trazer folhas para o fungo simbiote (FORTI; BOARETTO, 1997).

A relação simbiótica entre o fungo e as formigas proporciona benefícios a ambos (SCHULTZ et al., 2005), pois elas se beneficiam do fungo por meio da quebra de enzimas, possibilitando a desoxidação de compostos secundários oriundos dos vegetais e que poderiam agir como inseticidas naturais às formigas (NORTH et al., 1999). Já o fungo se beneficia, entre outras razões, pela manutenção do ambiente livre de microrganismos competidores, por meio da aplicação de compostos antibióticos produzidos pelas formigas (CURRIE et al., 1999a).

As formigas-cortadeiras integram um dos mais importantes grupos de insetos daninhos às culturas, conhecidos por atacarem intensamente e constantemente as plantas e causarem importantes danos à agricultura nacional (SANTOS, 2010). São consideradas a praga número um das lavouras, mesmo com o aperfeiçoamento de muitos métodos para seu controle (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005; SANTOS, 2010). Os processos de controle de formigas-cortadeiras incluem diferentes métodos e podem ser classificados de acordo com a formulação do formicida aplicação (NOGUEIRA et al., 1981). Entre os métodos de controle estão o controle mecânico, cultural, biológico e

químico. O controle químico é feito por meio de iscas granuladas, termonebulização, nebulização e pó seco, que envolvem altos custos (SANTOS, 2010).

Em estudos realizados pelo grupo de produtos naturais da UFSCar e o Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP-Rio Claro, foi observada a ação tóxica de extratos de plantas, seus ácidos graxos, assim como a associação de ácidos graxos com triglicerídeos sobre as operárias das formigas-cortadeiras e sobre o seu fungo simbiote. A busca por compostos com maior especificidade dirigidos ao controle de formigas-cortadeiras por ação fungicida, formicida ou ambos são bastante desejáveis (FERNANDES et al., 2002). Existem diversos fungicidas presentes no mercado agrícola, porém até o momento nenhum deles foi avaliado no controle do fungo mutualista *L. gongylophorus* cultivados pelas colônias de formigas-cortadeiras.

## 2. OBJETIVOS

Diante deste cenário, o presente trabalho teve como objetivo selecionar fungicidas, em diferentes formulações, que sejam tóxicos ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e verificar o comportamento das colônias de *Atta sexdens* após a aplicação dos produtos.

Especificamente:

- 1). Selecionar dentre os diferentes grupos de fungicidas com potencial de toxicidade no controle *in vitro* do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.
- 2). Realizar teste de toxicidade *in vitro* em operárias de *Atta sexdens* dos fungicidas com potencial de controle.
- 3). Aplicar os fungicidas com potencial de controle, nas formulações isca e nebulização, em colônias de *Atta sexdens* em condições de laboratório.
- 4). Registrar as alterações comportamentais das colônias de *Atta sexdens* frente ao tipo de formulação.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Formigas-cortadeiras como pragas

Um desequilíbrio ecológico fornece condições ideais de proliferação e estabelecimento das colônias de formigas-cortadeiras, e este fenômeno pode ocorrer com a introdução de monoculturas agrícolas e florestais. Estas formigas causam danos a diversas culturas como café, cana-de-açúcar, laranja, eucalipto, pinheiro, entre outras (CHERRETT, 1986). Além dos prejuízos na área agrícola, tais formigas podem causar danos a prédios, pontes, estradas de rodagem e de ferro, pois os túneis e câmaras das colônias são susceptíveis ao peso dessas construções. Assim, são inegáveis as perdas ocasionadas por estas formigas (MARICONI, 1970).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são considerados pragas em várias regiões do Brasil e da América e as perdas econômicas causadas por essas formigas atingem milhões de dólares por ano no Texas e cerca de US \$ 130 milhões por ano no Estado de São Paulo, Brasil (CAMERON; RIGGS, 1985; BRITTO, et al., 2016).

A espécie *A. sexdens* é considerada uma das principais pragas nas plantações de *Eucalyptus* spp., juntamente com *A. laevigata* causam 14% dos prejuízos na produção de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. (BOARETTO; FORTI, 1997; ZANUNCIO et al., 1999; CARLOS, 2008 apud AMANTE, 1967).

Dados mais realistas sobre a perda de produção de madeira de eucalipto causada por *Atta* spp. em diferentes locais foram obtidos por ZANETTI et al. (2000, 2003b) e SOUZA et al. (2011). Esses estudos mostraram que as colônias de *Atta* diminuíram a produção de madeira, pela desfolha que causam ao eucalipto. Densidades superiores a 80 ninhos por hectare (área de terra solta de 2,76 m<sup>2</sup>) podem reduzir mais de 50% de produção de madeira de eucalipto (ZANETTI et al., 2003b; OLIVEIRA et al., 2011).

As formigas-cortadeiras são responsáveis por 75% dos custos e do tempo total gasto no controle de pragas nos reflorestamentos (VILELA, 1986). A caracterização dos ninhos das formigas-cortadeiras é também uma dificuldade e impacta diretamente na implantação de novas técnicas de controle. Os ninhos subterrâneos apresentam muitas câmaras interligadas, e conectadas com a superfície através de longas galerias, o

que pode prejudicar a ampla disseminação de produtos dentro das colônias, bem como a determinação das dosagens apropriadas (MARINHO et al., 2006).

### **3.2 Métodos de controle de formigas-cortadeiras**

O controle mecânico de formigas-cortadeiras consiste na destruição dos ninhos da área por meio da escavação do formigueiro, que é efetuado até que a rainha seja localizada e morta. Essa alternativa de controle é aceitável quando realizada em pequenas áreas, sempre que os ninhos estiverem superficiais; porém na prática, o controle mecânico torna-se inviável em áreas de plantios comerciais, em reflorestamento e sistemas de pastagens (DELLA LUCIA et al., 1993; FORTI; BOARETTO, 1997).

O controle cultural consiste na aração e gradagem da área, dentro do prazo de quatro meses do início do formigueiro. Esse método é efetivo se a lâmina do arado matar a rainha. Esse controle não é utilizado para formigueiros adultos, porque a mecanização do solo pode descaracterizar parcialmente o formigueiro, cessando temporariamente a sua atividade e dando a falsa impressão de controle (DELLA LUCIA et al., 1993; FORTI; BOARETTO, 1997).

O controle biológico consiste no uso de predadores, parasitoides e micro-organismos que utilizam as formigas-cortadeiras como hospedeiro, porém a dificuldade nesse tipo de controle deve-se a vigilância social, base do controle higiênico do ninho de da colônia das formigas-cortadeiras e detecção de micro-organismos por meio das suas antenas (KERMARREC et al., 1993; FORTI; BOARETTO, 1997;). Desta forma, o controle biológico pela introdução de inimigos naturais ainda não pode ser considerado uma estratégia de controle para as formigas-cortadeiras (DELLA LUCIA et al., 1993).

O controle químico atualmente é o único que apresenta tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas-cortadeiras (JUSTI JUNIOR et al., 1996). Os inseticidas em pó seco são formulados em veículos sólidos (por exemplo, talco em pó) e são aplicados com equipamento de mão denominados polvilhadeiras. Portanto, é recomendável seu uso, somente quando o solo está seco. Além disso, há a necessidade de remover solos soltos antes da aplicação do produto, o que torna a técnica impraticável operacionalmente. Outra limitação é o risco de contaminação ao meio ambiente e operador (FORTI; BOARETTO, 1997). Os inseticidas em formulação em pó

seco são recomendados para uso complementar em situações específicas, por exemplo, para controlar algumas espécies de *Acromyrmex* e ninhos iniciais de *Atta* spp. No entanto, as formulações em pó não podem ser recomendadas como o principal e nem mesmo como o único método de controle, especialmente em grandes áreas, porque esta formulação apresenta baixa eficiência (BRITTO et al., 2016).

Entre os principais métodos de controle químico, um dos considerados mais efetivos é o uso de iscas granuladas. Em áreas florestais, as iscas granuladas são as preferidas para o controle de formigas-cortadeiras por serem as que apresentam menor custo, maior facilidade de aplicação e baixo risco de toxicidade aos humanos e ambiente do que os outros métodos de controle (ZANETTI et al., 2003; BRITTO et al., 2016).

A isca ideal deve ser atrativa à distância; carregada rapidamente para dentro do ninho; ter ação tóxica retardada, paralisando a atividade da colônia em alguns dias (para evitar a ativação dos mecanismos que impedem a intoxicação de toda colônia); específica e apresentar baixa toxidez a mamíferos e aves (FORTI et al., 1998; BRITTO, et al., 2016). Para formigas-cortadeiras de dicotiledôneas a polpa cítrica desidratada é o substrato atrativo mais efetivo e amplamente utilizado, embora já tenham sido utilizados outros materiais orgânicos, como milho, folha de eucalipto, farinha de mandioca, farelo de soja, farinha de trigo, bagaço e melaço de cana-de-açúcar. A polpa cítrica parece ser o substrato apropriado para o desenvolvimento do fungo simbiote por ser levemente ácida e ter alto conteúdo de carboidratos, nitrogênio, vitaminas e microelementos (BOARETTO; FORTI, 1997).

Os dois princípios ativos de ação inseticida usados na produção de iscas granuladas encontrados no mercado são: a sulfluramida e o fipronil, porém, o primeiro é o ingrediente ativo mais utilizado nestas iscas (TOFOLO, 2007; BRITTO et al., 2016).

Diversos estudos têm comprovado a elevada eficiência das iscas à base de sulfluramida no controle de saúvas que cortam dicotiledôneas, com registros de 90 a 100% de mortalidade de ninhos. No entanto, por ser uma substância do grupo dos perfluorooctano sulfonato, foi classificada como poluente orgânico em 2005 na Convenção de Estocolmo (ARAUJO, 2011). Na área de domissanitários, a sulfluramida foi excluída na formulação isca para controle de cupins, pasta para controle de baratas e pasta para controle de formigas (BRASIL, 2015). Desta forma, a procura por novos produtos é necessária, uma vez que o mesmo possa ocorrer na área agrícola e logo a sulfluramida pode não ser mais autorizada para o controle de formigas-cortadeiras.

Uma quantidade das iscas usadas no controle das formigas é perdida durante a aplicação no campo, pois nem todas são carregadas e parte das transportadas é rejeitada. Isto tem levado as empresas a investirem na melhoria do rendimento operacional das técnicas de controle químico e na experimentação de novas tecnologias, objetivando minimizar os impactos ao meio ambiente (FORTI et al., 2003; LOUREIRO; MONTEIRO, 2005).

A termonebulização e nebulização podem ser empregadas como um complemento ao uso de iscas, principalmente em períodos chuvosos (CRUZ et al., 1984). Apesar de apresentarem alguns fatores que explicam o baixo uso destas técnicas, como, manutenção de equipamentos, aumento de pessoas trabalhando e exposição dos trabalhadores aos inseticidas, a termonebulização pode apresentar alta eficiência para formigueiros grandes, especialmente nas operações de controle inicial, durante a implantação de florestas cultivadas. Além disso, esse método de controle pode ser utilizado em qualquer época do ano, em terrenos encharcados ou secos e não requer o preparo e medição dos formigueiros (ZANETTI et al., 2002; ANJOS et al. 1998; BRITTO et al., 2016). Nas plantações comerciais de *Eucalyptus* (Myrtaceae) e *Pinus* (Pinaceae) no Brasil e em outras culturas (cana-de-açúcar, citrino, pastagem) esses métodos de controle foram colocados em segundo plano, sendo usados em situações específicas. Por outro lado, atualmente existem poucos produtos registrados no MAPA para aplicações por termonebulização. Apenas o produto Gemini (permetrina - piretróide) comercialmente acessível, e para nebulização apenas o produto Bisfar UBV (bifentrina - piretróide), que hoje em dia não está sendo comercializado (BRITTO et al., 2016). A falta de opções de produtos para esse tipo de aplicação também pode ter sido um fator que ocasionou a colocação desse método em segundo plano.

### **3.3 Controle do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus***

Na busca por novas formas de controle, alguns autores têm realizado trabalhos visando fornecer subsídios sobre inibição ou beneficiamento no crescimento *in vitro* do fungo mutualista *L. gongylophorus*, porém o seu comportamento é complexo e de difícil entendimento, já que apresenta um crescimento lento em laboratório (SOUZA et al., 2011).

Alguns pesquisadores têm adicionado extratos vegetais em meios de cultura com o objetivo de catalisar o crescimento ou inibir o desenvolvimento *in vitro* do fungo, pois ele cresce eficientemente em componentes encontrados nas folhas das árvores (SIQUEIRA et al., 1998), ou pode ser prejudicado pelos metabólitos secundários (RIBEIRO et al., 1998). Estas substâncias, do ponto de vista evolutivo, seriam uma das estratégias utilizadas pelas plantas para se defenderem da herbivoria (ROCKWOOD, 1976).

Várias espécies vegetais já foram estudadas visando o controle de formigas-cortadeiras e algumas apresentaram efeitos satisfatórios, demonstrando regressão gradual tanto no número de formigas quanto na esponja do fungo. Tais resultados foram observados nas espécies *Sesamum indicum* (Pedaliaceae) (BUENO et al., 1994; MORINI et al., 2005) e *Cedrela fissilis* (Meliaceae) (BUENO et al., 2005).

Currie et al. (1999b) descobriram que fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) são parasitas específicos do fungo mutualista e somente foram encontrados nos jardins de fungo das formigas Attini. *Escovopsis* sp. é responsável por inibir o crescimento do fungo mutualista, atuando como um fungo micoparasita de *L. gongylophorus*. Aparentemente, ele é capaz de detectar substâncias químicas secretadas por *L. gongylophorus* e provocar a morte da hifa do hospedeiro sem a necessidade de contato direto (REYNOLDS; CURRIE, 2004; FOLGARAIT et al., 2011).

### **3.4 Fungicidas utilizados nos bioensaios**

#### **3.4.1 Piraclostrobina – Estrobilurinas**

O fungicida Piraclostrobina pertence ao grupo das estrobilurinas, que compreende inúmeras moléculas. Esses fungicidas apresentam como modo de ação em fungos, a transferência de elétrons no sítio Qo no complexo III nas mitocôndrias (FRAC, 2013). Estas moléculas vêm sendo utilizadas desde os anos 90 para uma diversidade de patógenos fúngicos desde então.

#### **3.4.2 Epoxiconazole e Metconazole – Triazóis**

Os triazóis Epoxiconazole e Metconazole pertencem ao grupo dos inibidores de biossíntese de esteróis, o qual constitui o maior e o mais importante grupo de compostos

já desenvolvidos para o controle de doenças fúngicas de plantas e animais, exibindo vários graus de sistemicidade e, frequentemente, altíssima potência antifúngica (BALARDIN, 2015).

### **3.4.3 Fluxapyroxad e Boscalida – Carboxamida**

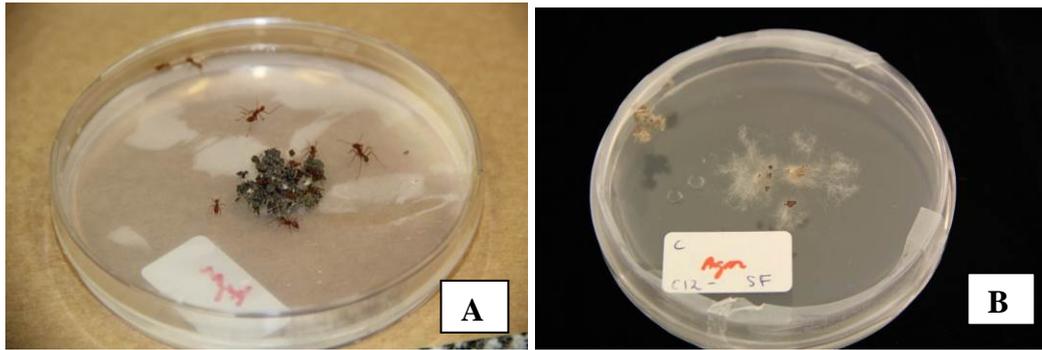
Os fungicidas fluxapiróxade e boscalida, pertencem a classe das carboxamida, ele atua no Complexo II, por meio da inibição da enzima succinato desidrogenase. Esse complexo, utiliza o aceptor de elétrons FAD para efetuar a transferência de elétrons FADH<sub>2</sub> para a Coenzima. Através da inibição do complexo II, os fungicidas deste grupo inibem o crescimento do fungo desprovendo suas células de sua fonte de energia e eliminando a disponibilidade de blocos para a síntese de componentes essenciais nas células (ZAMBOLIM, et al. 2007).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção de colônia pura do fungo**

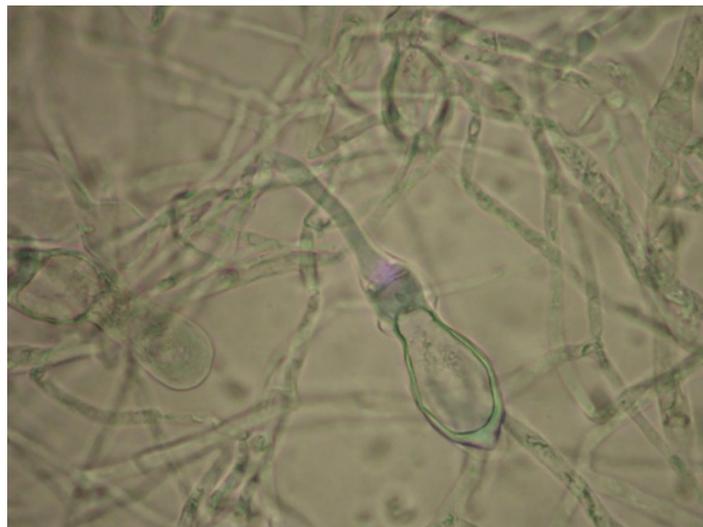
Para a seleção dos fungicidas tóxicos para *L. gongylophorus*, inicialmente foi necessária a obtenção da colônia pura do fungo. Para isso foram isoladas pequenas porções de fungo ( $\pm 10$ g) com presença de sete operárias médias-pequenas com cápsula cefálica de 1 a 1,4 mm.

Foram montados dez grupos de fungos com operárias, em placas de Petri (90x15mm) por 24 horas em incubadora B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) sob temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e na ausência de luz constante (Figura 1). Após 24 horas as placas foram refrigeradas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 minutos para auxiliar na remoção das operárias. Em seguida, fragmentos de 8 mm dos fungos passaram por um processo de desinfecção superficial, submetidos a 30 minutos em álcool 70%, 30 minutos em NaCl 2% e 30 minutos em água autoclavada. Após o processo de desinfecção, os fragmentos de fungos por meio da técnica de esfregaço, foram inoculados em meio Ágar 2% e mantidos em incubadora B.O.D à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  na ausência de luz constante (PAGNOCCA et al., 1990; BORBA et al., 2006) (Figura 1).



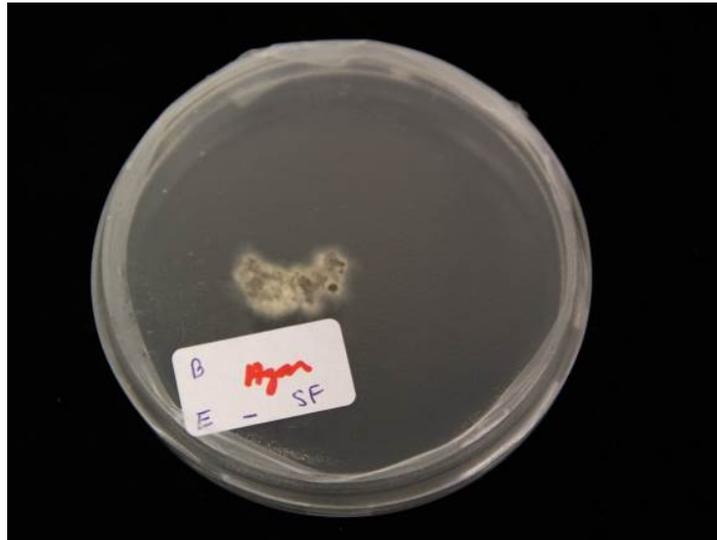
**Figura 1.** (A) Isolamento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* com presença de operária de *Atta sexdens*, (B) Esfregaço do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em meio Ágar 2%.

Após o crescimento, para confirmação se o fungo isolado nas placas de Petri era o mesmo cultivado pelas formigas, foram efetuadas observações ao microscópio para comprovar a presença das estruturas denominadas gongilídeos, que são únicas do fungo *L. gongylophorus* (CASTELLANI et al. 2007; MIYASHIRA et al. 2010; SOUZA et al. 2011) (Figura 2).



**Figura 2.** Gongilídeos maduros do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (objetiva 350x).

A repicagem para a manutenção da colônia fúngica foi realizada por meio do implante de fragmentos do fungo de 0,8mm em meio de cultura Batata Dextrose e Ágar (BDA) contido no interior de placas de Petri, numa câmara de fluxo laminar e com os devidos procedimentos de assepsia adotados para o manuseio do material (Figura 3). As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. entre  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  na ausência de luz constante (PAGNOCCA et al., 1990; BORBA et al., 2006).



**Figura 3.** Desenvolvimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em meio Ágar 2%.

#### 4.2 Seleção de fungicidas tóxicos ao fungo simbiote

Neste bioensaio foram avaliados cinco fungicidas, Boscalida, Epoxiconazole, Fluxapyroxad, Metconazole e Piraclostrobina. As concentrações avaliadas de cada fungicida foram 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ppm com quatro repetições para cada concentração em cada tratamento (Tabela 1).

**Tabela 1.** Delineamento experimental com fungicidas e concentrações avaliadas no teste de toxicidade *in vitro* para controle do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

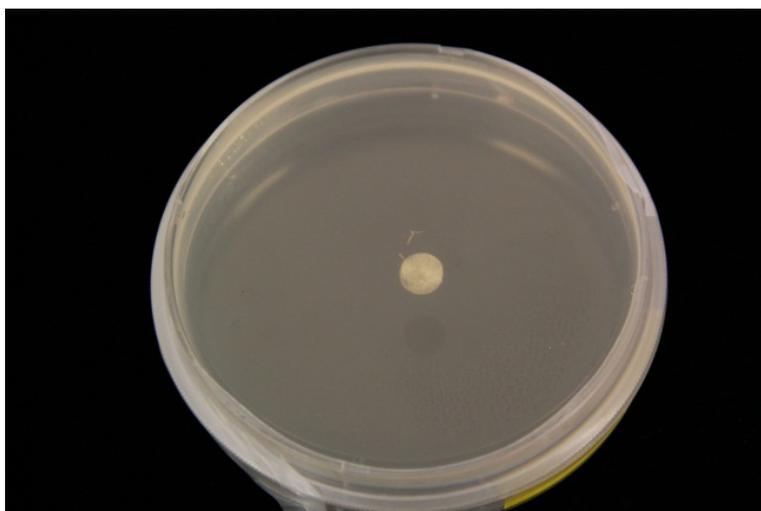
#### DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Tratamentos	Concentrações (ppm)	Repetições
Testemunha	0	
Piraclostrobina	100 – 10 – 1 – 0,1 – 0,01	4
Fluxapyroxad	100 – 10 – 1 – 0,1 – 0,01	
Boscalida	100 – 10 – 1 – 0,1 – 0,01	
Metconazole	100 – 10 – 1 – 0,1 – 0,01	
Epoxiconazole	100 – 10 – 1 – 0,1 – 0,01	

Para o preparo dos tratamentos, foi realizado o preparo de meio de cultura BDA. Após o resfriamento os fungicidas foram incorporados no meio de cultura e vertidos em

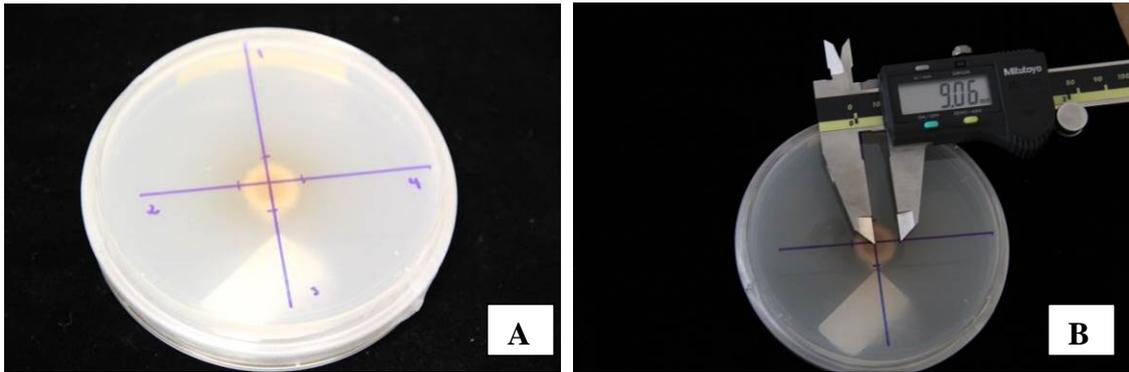
placas de Petri 90x15mm e mantidas em incubadora B.O.D  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  na ausência de luz constante. Para o tratamento controle foi utilizado apenas o meio de cultura BDA.

Após 24 horas do preparo das placas de Petri com os tratamentos, foram inoculados discos de 0,8mm provenientes das culturas puras do fungo *L. gongylophorus*. As placas foram seladas com parafilme e mantidas em incubadora B.O.D.  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  na ausência de luz constante (Figura 4).



**Figura 4.** Discos (8mm) do meio de cultura de *Leucoagaricus gongylophorus* inoculados ao centro da placa do tratamento Controle.

Para a avaliação do crescimento micelial foi avaliado macroscopicamente com base no diâmetro da colônia, em milímetros, com avaliações aos 7, 14, 28, 35 e 42 dias após a inoculação. Após 42 dias, foram traçadas duas retas perpendiculares com ponto de cruzamento coincidindo com o centro do disco do inóculo e realizada as medidas a partir da borda do inóculo até a extremidade do crescimento do fungo, sendo, em seguida, calculado o valor médio dos diâmetros para cada placa (BORBA et al. 2006; SOUZA et al. 2011) (Figura 5). A partir dos dados obtidos foi realizada análise estatística com o Programa SASM-Agri 8.2 (2004) e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro. A partir destes resultados foram selecionados os fungicidas potenciais para controle do fungo *L. gongylophorus*.



**Figura 5.** (A) Linhas traçadas perpendicularmente ao centro do inóculo, (B) Mensuramento do crescimento com o auxílio de um paquímetro digital.

### 4.3 Coleta de colônias de *Atta sexdens* em campo e manutenção em laboratório

Duzentas colônias de *Atta sexdens* foram coletadas nos municípios de Itirapina/SP e Mogi Guaçu/SP, no mês de março de 2016 e levadas para o laboratório de P&SS da BASF S.A., localizado na cidade Santo Antônio de Posse, SP.

Os ninhos coletados apresentavam uma única câmara de fungo de aproximadamente 10 a 15 cm de diâmetro, localizada a poucos centímetros da superfície, facilitando sua escavação (Figura 6) (AUTUORI, 1941). A idade aproximada das colônias era de 3 a 4 meses.



**Figura 6.** Ninho de formiga cortadeira *Atta sexdens* coletado em campo.

Cada colônia foi acondicionada em recipiente plástico transparente de 1000 mL contendo uma camada de gesso no fundo para manter a umidade do jardim de fungo. Posteriormente, outros dois recipientes plásticos de 500 mL foram interligados ao

primeiro por tubos plásticos transparentes, sendo um para fornecimento do substrato vegetal (câmara de forrageamento) e outro para deposição de lixo pelas formigas (câmara de lixo) (Figura 7). A alimentação ofertada foi a base de folhas de *Eucalyptus* sp., *Acalypha* sp., e periodicamente milho moído (*Zea mays*) e flocos de aveia (*Avena* sp.). No laboratório, as colônias foram acondicionadas em uma sala com condições controladas de temperatura e umidade, 25°C e 70% de UR, respectivamente (FREITAS, 2010; MARIN, 2014).



**Figura 7.** Colônias de formiga cortadeira *Atta sexdens* mantida em laboratório.

#### **4.4 Bioensaios *in vitro* de toxicidade em operárias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório.**

As operárias de *A. sexdens* utilizadas no bioensaio, foram de tamanho médio com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, obtidas de ninhos artificiais adultos (Figura 8), mantidos em salas climatizadas com temperatura de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  e U.R de 70%, no Laboratório de Insetos Sociais (CEIS) da Unesp em Rio Claro/SP.

Para a manutenção destes formigueiros, foi oferecido, diariamente, folhas de *Eucalyptus* sp., *Acalypha* sp., flocos de aveia, farinha de milho, e, ocasionalmente, pétalas de roseiras, folhas de mangueira e eucalipto.



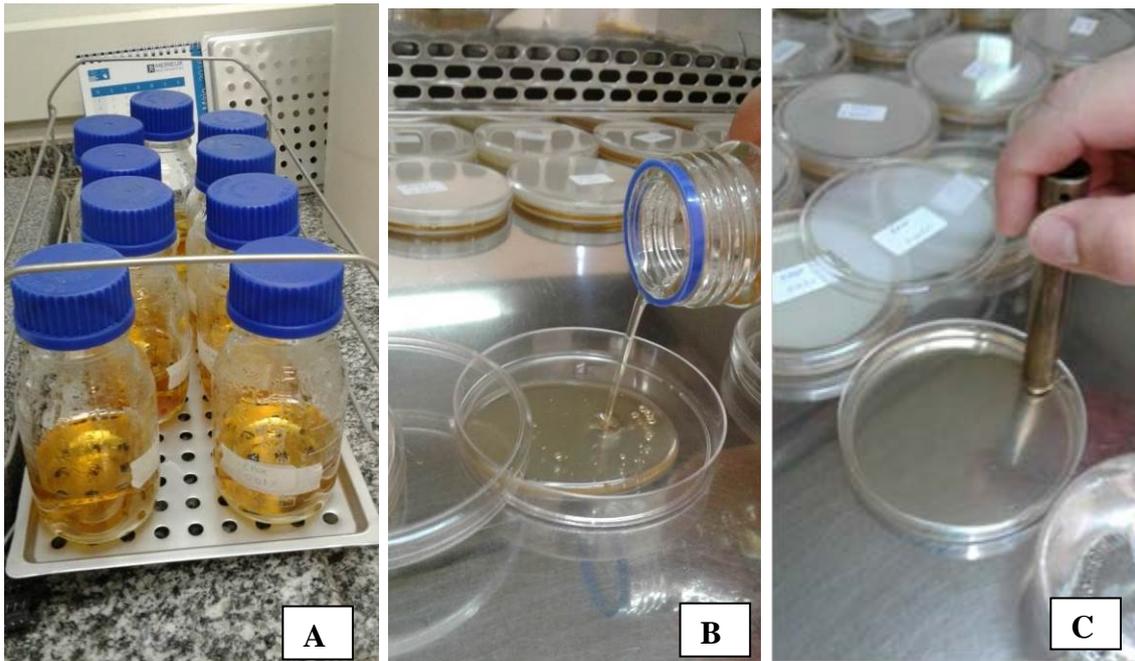
**Figura 8.** Ninho artificial de formiga cortadeira *Atta sexdens* mantido em laboratório no Centro de Insetos Sociais (CEIS) da Unesp- Rio Claro/SP.

#### **4.5 Dieta artificial para manutenção das formigas**

Para manutenção das formigas *in vitro*, foi preparada uma dieta artificial sólida com 0,25 g de peptona bacteriológica, 0,25 g de ágar bacteriológico, 0,025 g de extrato de levedura e 1,25 g de glicose, dissolvidos em 25 mL de água destilada. Juntamente com essa mistura, nas placas dos tratamentos, foram adicionados os fungicidas selecionados Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole. As concentrações avaliadas para cada fungicida foram 1, 10, 100 e 1000 ppm.

Após a realização deste bioensaio, foi feito um segundo bioensaio *in vitro* com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações de 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 e 0,2%.

A mistura foi homogeneizada e em seguida autoclavada a 120° C e 1 atm, por aproximadamente 20 minutos. Depois, a dieta foi vertida em placas de Petri de 90x15 mm de diâmetro previamente esterilizadas na autoclave e, após o resfriamento, foram feitos discos de 4 mm e as placas foram envolvidas com filme PVC e mantidas na geladeira para melhor conservação durante o período do bioensaio (Figura 9) (BUENO et al., 1997).



**Figura 9.** A- Preparo da dieta artificial sólida para bioensaio *in vitro*. B- Dieta sendo vertida em placas de Petri de 90x15mm. C- Após solidificação foram marcados discos de 4 mm para utilização no bioensaio.

#### 4.6 Bioensaio de toxicidade

Para a realização do bioensaio, as formigas foram coletadas do formigueiro e colocadas em uma bandeja plástica, com as paredes laterais revestidas com Teflon-30 e no interior da bandeja foi mantido algodão embebido em água.

As formigas foram agrupadas em dez indivíduos e colocadas em placas de Petri descartáveis, de 10 cm de diâmetro, forradas com papel filtro. Cada placa recebeu, diariamente, um disco de 4 mm (aproximadamente 0,5 g) de dieta artificial que foi colocado sobre um pedaço de papel alumínio. Para o controle, foi utilizada a dieta pura, ou seja, sem os fungicidas (Figura 10).

Foram utilizadas cinco placas para cada tratamento do primeiro bioensaio com os fungicidas isolados e para o segundo bioensaio com a mistura dos fungicidas, que equivalem a um lote de 50 formigas. Essas placas foram colocadas ao acaso nas prateleiras de uma incubadora B.O.D., com temperatura média de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa acima de 70%. Foram examinadas diariamente, para retirada e anotação do número de formigas mortas e para a troca da dieta artificial e do papel filtro (Figura 11).

O bioensaio foi avaliado por 25 dias, período máximo de sobrevivência das operárias submetidas a essas condições (BUENO et al., 1997; BUENO, 2013).



**Figura 10.** Repetição do tratamento de dieta artificial com Piraclostrobina 0,001% em placa de Petri com operárias de *Atta sexdens*.



**Figura 11.** Tratamentos durante avaliação do bioensaio armazenados em incubadora BOD com temperatura média de 24+1°C e umidade relativa acima de 70%.

#### 4.7 Análise de dados

Para a análise dos dados, foi utilizado o “software” Graph-Pad, aplicativo Prisma 5.04. Inicialmente foram traçadas as curvas de sobrevivência para cada tratamento a partir das porcentagens de formigas vivas, por dia, no conjunto de cinco placas.

Para a análise estatística dos resultados obtidos após o período de 25 dias, foi empregado o teste não paramétrico “long-rank”. As curvas de sobrevivência dos tratamentos foram comparadas com a do controle.

#### 4.8 Bioensaio de nebulização em colônias mantidas em laboratório

Após a estabilização das colônias coletadas em campo e crescimento dos formigueiros até cerca de 1 litro de fungo, ideal para a realização dos bioensaios (FREITAS, 2010), foi realizado o bioensaio de nebulização. Foram utilizadas três colônias para cada tratamento avaliado, além do grupo testemunha, que também teve três colônias de formigas.

Para a realização do bioensaio, foi utilizado um equipamento composto por compressor portátil, acoplado a um nebulizador pequeno que é utilizado para inalação. A panela de forrageamento foi removida do ninho e o equipamento foi acoplado para a aplicação da nebulização. Para a diluição dos ingredientes ativos foi utilizado acetona e para homogeneização dos componentes foi utilizado o emulsificante Tween 80. Os tratamentos com os ingredientes ativos Piraclostrobina, Epoxiconazol e Metconazole foram diluídos e avaliados nas concentrações de 0,5, 1 e 2%. Cada colônia recebeu 5 mL da diluição e após a aplicação foi recolocada a panela de forrageamento (KENNARD,1965; SANTOS-OLIVEIRA, 2006; FREITAS, 2010) (Figura 12).



**Figura 12.** Aplicação dos tratamentos com fungicidas em método de nebulização nos formigueiros de *Atta sexdens*.

No dia anterior a realização do bioensaio, todo o resto de folhas não cortadas e lixo foram removidos das panelas de alimentação e de lixo, respectivamente. As colônias ficaram sem receber nenhum tipo de alimentação por 24 horas. Isso foi feito para que o corte das folhas oferecidas às formigas após a nebulização fosse estimulado. Após 24 horas da aplicação da nebulização, todas as colônias voltaram a receber a alimentação de três folhas de *Eucalyptus* sp. diariamente e, durante sete dias, foram realizadas avaliações diárias por meio de avaliações visuais, observando-se: intoxicação de formigas, mortalidade de formigas, corte de folhas, fungo cortado na câmara de fungo ou de lixo, condições do saueiro, alteração no jardim de fungo, mudança de panela, contaminação de fungo filamentososo *Escovopsis*, redução no jardim de fungo e rainha morta (Figura 13).



**Figura 13.** Formigueiros de *Atta sexdens* após nebulização com fungicidas durante avaliações de comportamento.

Para a avaliação dos comportamentos foi utilizada a escala de quantificação segundo Freitas (2010):

Intoxicação de formigas: 0- sem sintomas de intoxicação; 1- até 25% das formigas com sintomas; 2 – 50% das formigas com sintomas; 3- 75% das formigas com sintomas; 4- 100% das formigas com sintomas ou mortas.

Mortalidade das formigas: 0- sem mortalidade; 1- até 25% das formigas mortas; 2- 50% das formigas mortas; 3- 75% das formigas mortas; 4- 100% das formigas mortas.

Corte de folhas: 0 – sem corte de folhas; 1 – corte de 25% das folhas; 2- corte de 50% das folhas; 3- corte de 75% das folhas; 4- corte de 100% das folhas.

Colônias com mudança de panela: 0- sem mudança de panela; 1- com mudança de panela. A mudança de panela pode indicar que as formigas perceberam alguma ameaça, como alguma substância tóxica (fumaça) e por isso esse comportamento de levar o fungo e as crias para outro lugar mais seguro, ou seja, para a panela de alimentação.

Presença de fungo filamentososo: 0 – sem ocorrência de contaminação; 1- com ocorrência de contaminação.

Corte de fungo: 0 – sem corte de fungo; 1 – 25% do fungo cortado; 2 – 50% do fungo cortado; 3- 75% do fungo cortado; 4- 100% do fungo cortado.

Mortalidade da rainha: avaliação da sobrevivência da rainha. Observação realizada diariamente e classificada como: 0 - rainha viva; 1 - rainha morta.

A análise gráfica de cada um dos comportamentos observados foi realizada através dos valores acumulados das três repetições.

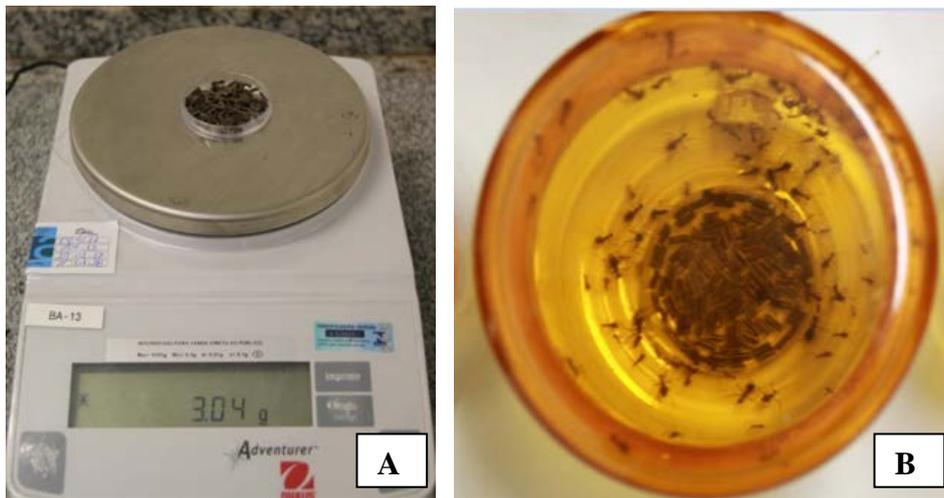
#### **4.9 Bioensaio de iscas em colônias mantidas em laboratório**

Para a realização do bioensaio, foram selecionadas as colônias coletadas em campo e mantidas no laboratório. Foram utilizadas três colônias para cada tratamento avaliado, além do grupo testemunha, que também foi composto por três colônias de formigas.

As colônias foram mantidas em sala climatizada e abastecidas diariamente com três folhas de *Eucalyptus* sp. (MARIN, 2014). No laboratório, as colônias foram acondicionadas em uma sala com condições controladas de temperatura e umidade, a 25°C e 70% de UR, respectivamente, até que o jardim de fungo atingisse o volume ideal para a realização dos testes, com 1 L (FREITAS, 2010; MARIN, 2014). Para a realização deste bioensaio, foram utilizados os fungicidas Piraclostrobina e Metconazole em mistura, já que apresentaram resultados promissores nas primeiras etapas do projeto. As iscas peletizadas com tamanhos variando de 5 a 7 mm, foram formuladas no laboratório do CEIS da UNESP em Rio Claro, SP utilizando a polpa cítrica desidratada como atrativo e a mistura dos fungicidas nas concentrações 0,1%; 0,3%; 0,5% e 0,75%.

No dia anterior a realização do bioensaio, todo o resto de folhas não cortadas e

lixo foram removidos das panelas de alimentação e de lixo, respectivamente. As colônias ficaram sem receber nenhum tipo de alimentação por 24 horas, sendo então pesadas em balança semi-analítica. A seguir foi oferecido 3g das iscas peletizadas nas câmaras de forrageamento em cada tratamento (Figura 14). No tratamento controle foi oferecido a isca peletizada sem ingrediente ativo.



**Figura 14.** A- Pesagem de isca em balança semi-analítica. B- Isca sendo oferecida em câmara de forrageamento nos formigueiros de *Atta sexdens*.

Depois de 24 horas de apresentação, a sobra do material foi retirada e pesada, estimando-se o carregamento da isca peletizada. Além disso, a incorporação da isca no jardim de fungo e a ocorrência de devolução também foram avaliadas após 24 horas.

As colônias voltaram a receber o suprimento usual após 24 horas (três folhas de *Eucalyptus* sp.) e durante as três semanas subsequentes foram realizadas avaliações diárias, baseadas nas observações de: intoxicação das formigas, corte de folhas, mortalidade de formigas, mudança de panela, presença de fungo filamentososo, presença de pedaços de fungo no lixo, diminuição do fungo simbiote, mortalidade de rainha e condições da colônia (FORTI et al., 1993). Além disso, todo material presente nas panelas de lixo e de alimentação foi retirado semanalmente (Figura 15).



**Figura 15.** Formigueiros de *Atta sexdens* após inserção de iscas impregnadas com fungicidas durante avaliações de comportamento.

Os comportamentos a seguir, foram avaliados com as seguintes escalas de quantificação (BUENO, 2005):

Carregamento da isca pelas formigas: 0 - sem carregamento; 1 - carregamento de 25%; 2 - carregamento de 50%; 3 - carregamento de 75%; 4 - carregamento de 100%.

Incorporação da isca no jardim de fungo: 0 - sem incorporação; 1 - incorporação de 25%; 2 - incorporação de 50%; 3 - incorporação de 75%; 4 - incorporação de 100%.

Devolução da isca: 0 - sem devolução; 1 - devolução de 25%; 2 - devolução de 50%; 3 - devolução de 75%; 4 - devolução de 100%.

Intoxicação de formigas: 0 - sem sintomas de intoxicação; 1 - 25% das formigas com sintomas; 2 - 50% das formigas com sintomas; 3 - 75% das formigas com sintomas e; 4 - 100% das formigas com sintomas.

Corte de folhas: 0 - sem corte de folhas; 1 - corte de 25% das folhas; 2 - corte de 50% das folhas; 3 - corte de 75% das folhas; 4 - corte de 100% das folhas.

Mortalidade de formigas: 0 - sem mortalidade de formigas; 1 - 25% das formigas mortas; 2 - 50% das formigas mortas; 3 - 75% das formigas mortas e; 4 - 100% das formigas mortas.

Colônia com mudança de câmara: 0 - sem mudança de panela e; 1 - com mudança de panela.

Corte de fungo: 0 - sem corte de fungo; 1 - 25% do fungo cortado; 2 - 50% do fungo cortado; 3 - 75% do fungo cortado; 4 - 100% do fungo cortado.

Colônia com redução no jardim de fungo: 0 - sem redução; 1 - com redução.

Colônia com fungo filamentosos: 0 - sem ocorrência de contaminação; 1 - com ocorrência de contaminação.

Rainha morta: 0 - rainha viva; 1 - rainha morta.

Condições da colônia: 0 - colônia completamente morta; 1 - regressão de 75% da colônia; 2 - regressão de 50% da colônia; 3 - regressão de 25% da colônia e; 4 - colônia em perfeitas condições.

Os comportamentos anteriormente descritos foram observados durante 20 dias e foi feita a análise gráfica por meio dos valores acumulados das três repetições (colônias) (BUENO, 2005; MARIM, 2014).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

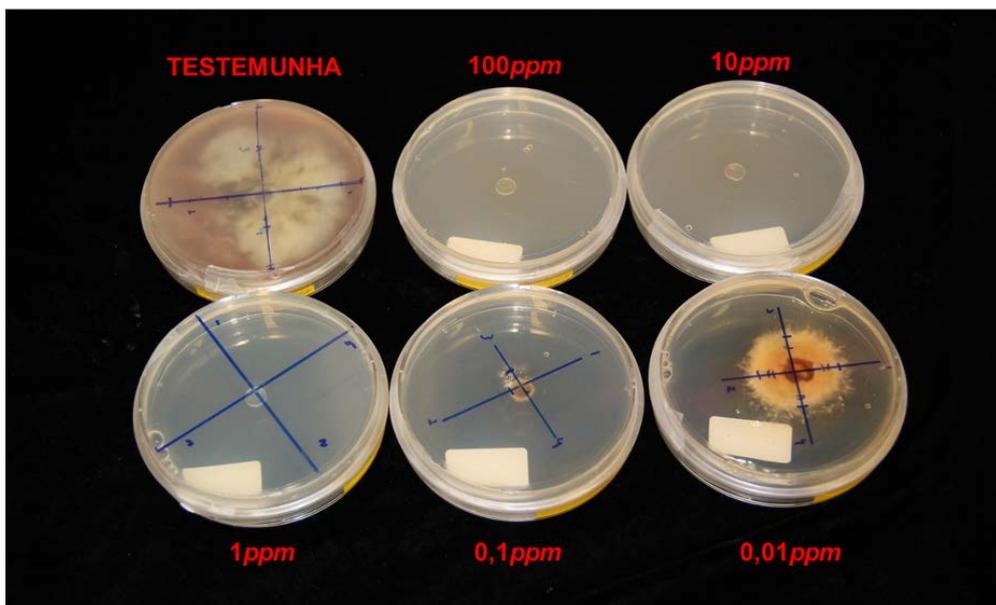
### 5.1 Crescimento micelial *in vitro* do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* frente aos fungicidas avaliados

A adição dos fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole ao meio BDA evidenciou porcentagem de inibição de 100% do crescimento do fungo *L. gongylophorus* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm, diferindo estatisticamente das mesmas concentrações para os ativos avaliados Fluxapyroxad e Boscalida. Na concentração de 0,1 ppm não houve diferença estatística entre os ativos Piraclostrobina e Metconazole. Na concentração 0,01 ppm o ativo Piraclostrobina diferiu dos demais ativos avaliados, porém os três fungicidas (Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole) mostraram ser fungicidas potenciais para o controle do fungo simbionte das formigas-cortadeiras *L. gongylophorus* (Tabela 2) (Figuras 16 a 18).

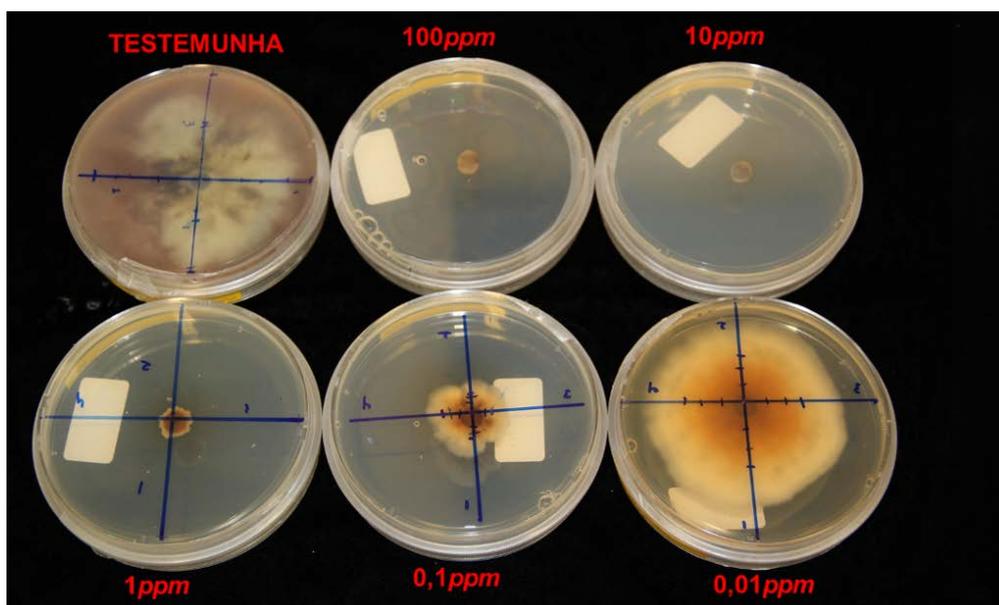
**Tabela 2.** Média da porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus* frente aos fungicidas avaliados em diferentes concentrações (ppm) após 42 dias.

<b><sup>1</sup>Inibição de crescimento micelial (%)</b>					
<b>Tratamento</b>	<b>0,01 ppm</b>	<b>0,1 ppm</b>	<b>1 ppm</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>
<b>Piraclostrobina</b>	71,84 <sup>d</sup>	97,79 <sup>c</sup>	98,69 <sup>b</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>
<b>Metconazole</b>	46,08 <sup>c</sup>	87,75 <sup>c</sup>	97,36 <sup>b</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>
<b>Epoxiconazole</b>	32,65 <sup>bc</sup>	47,34 <sup>b</sup>	89,32 <sup>b</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>
<b>Fluxapyroxad</b>	12,98 <sup>ab</sup>	17,48 <sup>a</sup>	08,95 <sup>a</sup>	47,49 <sup>c</sup>	47,92 <sup>c</sup>
<b>Boscalida</b>	07,96 <sup>a</sup>	16,08 <sup>a</sup>	08,34 <sup>a</sup>	27,66 <sup>b</sup>	42,07 <sup>b</sup>
<b>Controle</b>	00,00 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>	00,00 <sup>a</sup>

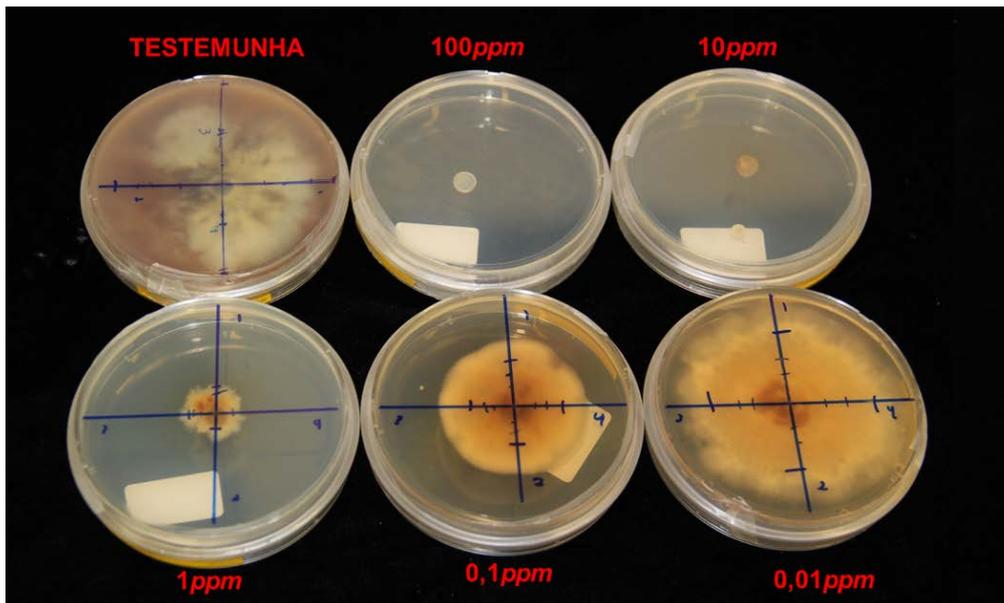
<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 16.** Crescimento micelial após 42 dias nas concentrações avaliadas para o tratamento com o fungicida Piraclostrobina.

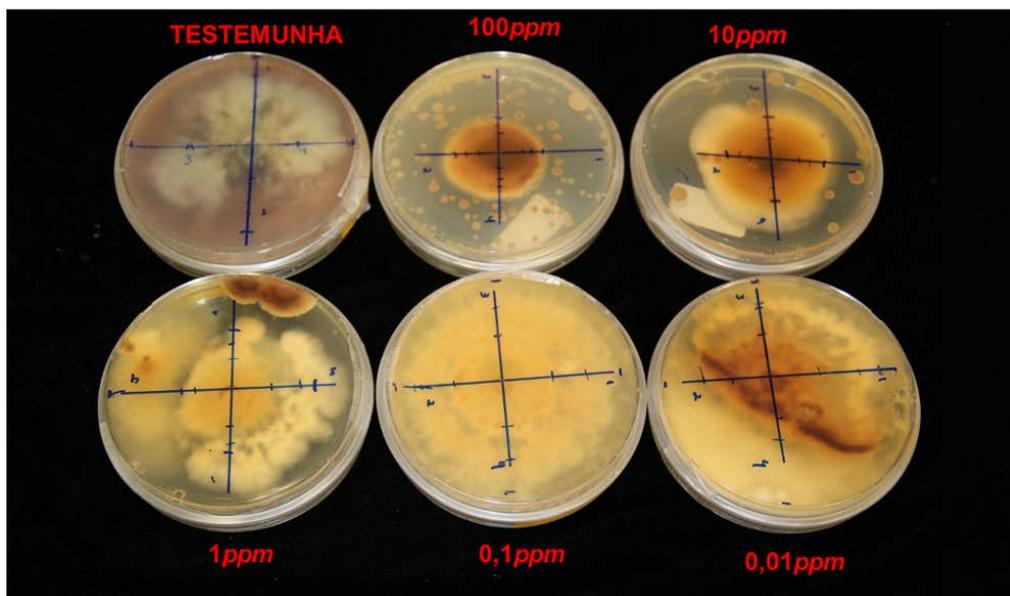


**Figura 17.** Crescimento micelial após 42 dias nas concentrações avaliadas para o tratamento com o fungicida Metconazole.



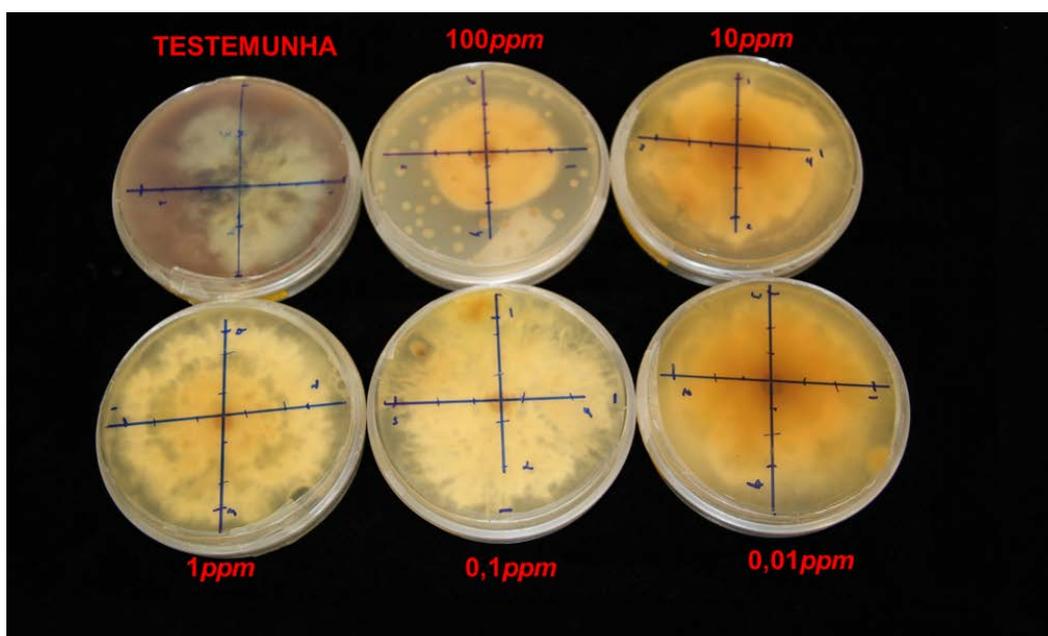
**Figura 18.** Crescimento micelial após 42 dias nas concentrações avaliadas para o tratamento com o fungicida Epoxiconazole.

O fungicida Fluxapyroxad, mostrou resultados estatisticamente iguais ao controle nas concentrações 0,1 e 1 ppm. Nas maiores concentrações 10 e 100 ppm houve inibição significativa no crescimento do fungo *L. gongylophorus*, porém foi menos efetivo quando comparado aos outros fungicidas avaliados (Figura 19).



**Figura 19.** Crescimento micelial após 42 dias nas concentrações avaliadas para o tratamento com o fungicida Fluxapyroxad.

Para o fungicida Boscalida a inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* foi a menos efetiva comparada aos outros fungicidas avaliados, obtendo-se resultados estatisticamente iguais ao controle nas menores concentrações 0,01; 0,1 e 1 ppm. Para as maiores concentrações, 10 e 100 ppm os resultados foram estatisticamente diferentes do controle, porém menos efetivos e estatisticamente diferentes quando comparados aos outros fungicidas avaliados, mostrando assim não ser um fungicida potencial para uso no controle do fungo *L. gongylophorus* (Figura 20).



**Figura 20.** Crescimento micelial após 42 dias concentrações avaliadas para o tratamento com o fungicida Boscalida.

Este trabalho é pioneiro na literatura no uso de fungicidas para inibição do fungo *L. gongylophorus*. Entre os trabalhos já realizados por outros autores, foi verificada a adição de extratos vegetais incorporados ao meio BDA (SOUZA et al., 2011), onde foi observada inibição de crescimento micelial e favorecimento do desenvolvimento do fungo *L. gongylophorus* nos tratamentos avaliados, uma vez que houve desenvolvimento micelial diferenciado dos fungos, crescendo nas condições avaliadas, comparadas ao controle. De acordo com Hebling et al. (2000) os componentes das folhas de algumas plantas exercem forte efeito sobre o desenvolvimento do fungo simbiote, beneficiando ou prejudicando seu crescimento.

Por exemplo, em trabalho realizado por GODOY (2003), alguns compostos isolados de *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae), como as frações de acetato e metanol do extrato hexânico de galhos da planta, apresentaram 80% de inibição do fungo simbiote *L. gongylophorus* nas concentrações de 448 e 288 µg/mL. Já substâncias denominadas policetídeos isoladas de *C. fissilis* apresentaram 100% de inibição do fungo simbiote na concentração de 42 µg/mL.

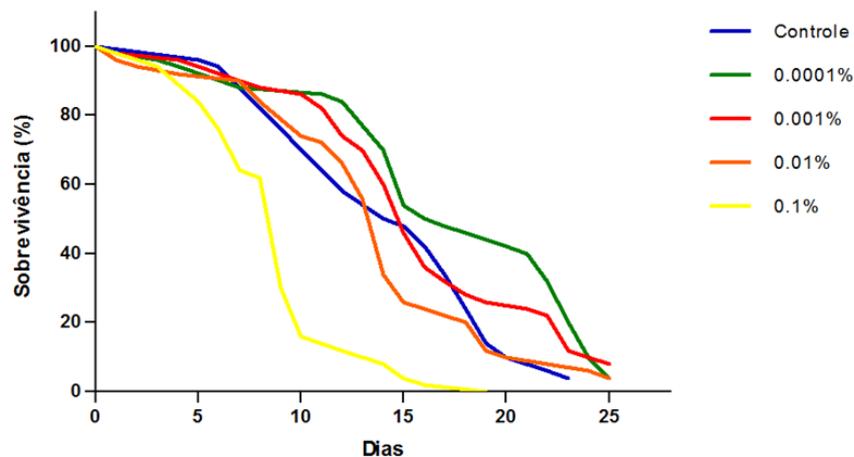
MOIA (2014) verificou a inibição do fungo *L. gongylophorus* através de filtrados de microfungos onde filtrado de *Trichoderma spirale* SC069 (Hypocreales: Hypocreaceae), e *T. harzianum*, apresentaram média de inibição significativa após 14 dias de crescimento. A autora observou também que os fungos endofíticos de cacauero *Verticillium* sp. (Hypocreales: Hypocreaceae) e *Clonostachys* sp. (Hypocreaceae: Bionectriaceae) inibiram significativamente o fungo *L. gongylophorus*.

No caso dos fungicidas avaliados nesta pesquisa, foi evidenciada maior efetividade na inibição no crescimento do fungo *L. gongylophorus* para os fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole, sendo eles, então, selecionados para as demais etapas deste trabalho.

## **5.2 Bioensaio *in vitro* de toxicidade em operárias de *Atta sexdens***

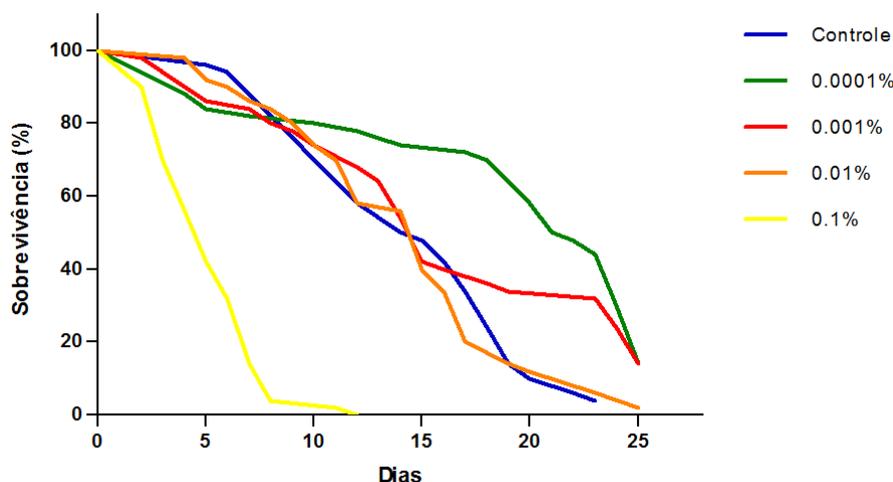
Não foi observado efeito de toxicidade nas operárias de *Atta sexdens* para o fungicida Piraclostrobina nas concentrações 0,0001, 0,001, 0,01%, exceto na concentração de 0,1% que mostrou efeito tóxico por ingestão e se comportou como inodoro e não repelente. A concentração 0,1% de Piraclostrobina caracterizou-se com ação inseticida, pois apresentou curva de sobrevivência com mortalidade mais rápida comparada ao tratamento controle e as outras concentrações avaliadas, mostrando ter potencial no controle de formigas em condições laboratoriais (Figura 21).

De acordo com Costa Leonardo e Thorne (1995) a concentração ótima de um ingrediente ativo para utilização em isca de controle não deve influenciar a alimentação da espécie alvo, garantindo assim que uma quantidade suficiente do ingrediente ativo a ser ingerido seja distribuída por indivíduos da colônia antes de sua ação inseticida. Além disso, o inseticida deve ser inodoro e não repelente.



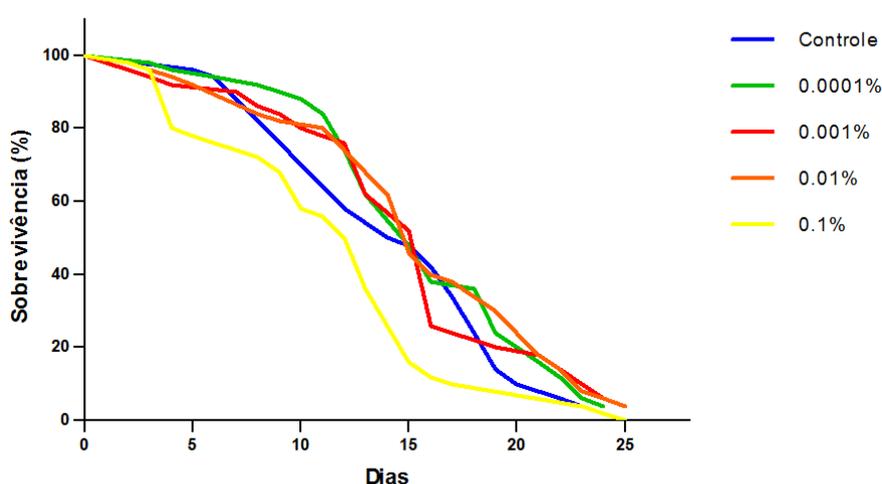
**Figura 21.** Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens*, submetidas ao bioensaio de ingestão de dieta artificial com o ingrediente ativo Piraclostrobina em diferentes concentrações ( $P < 0,0001$ ).

Para o fungicida Metconazole, todas as concentrações avaliadas (0,0001, 0,001, 0,01%) exceto a concentração de 0,1% não mostraram efeito tóxico por ingestão em formigas operárias de *Atta sexdens* e também se comportou como inodoro e não repelente. A concentração 0,1% de Metconazole caracterizou-se com ação inseticida pois apresentou curva de sobrevivência com mortalidade mais rápida comparada ao tratamento controle e às outras concentrações avaliadas, mostrando ser potencial no controle de formigas em condições laboratoriais (Figura 22).



**Figura 22.** Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens*, submetidas ao bioensaio de ingestão de dieta artificial com o ingrediente ativo Metconazole em diferentes concentrações ( $P < 0,0001$ ).

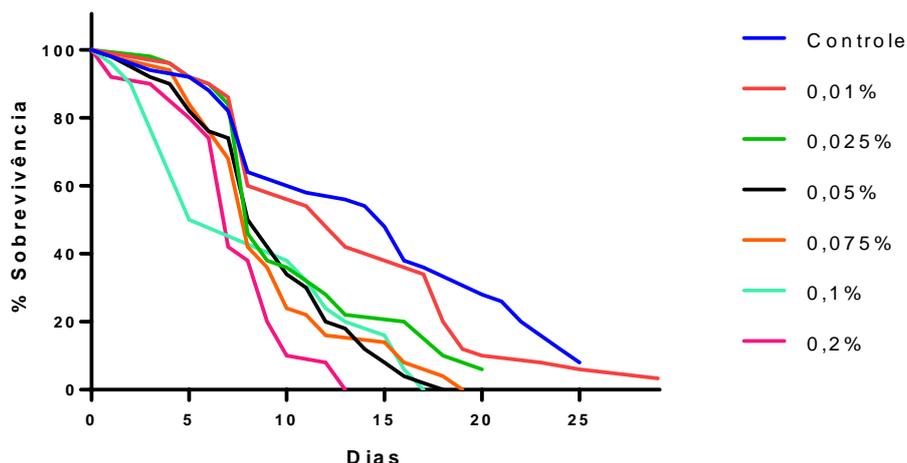
Para o fungicida Epoxiconazole, todas as concentrações avaliadas (0,0001, 0,001, 0,01 e 0,1%) não mostraram efeito tóxico por ingestão em formigas operárias de *Atta sexdens*, apesar de também ter se comportado como inodoro e não repelente. Epoxiconazole não se caracterizou com ação inseticida, pois apresentou curva de sobrevivência com mortalidade semelhante para todas as concentrações avaliadas comparada ao tratamento controle mostrando não ser potencial no controle de formigas em condições laboratoriais (Figura 23). Após apresentação desses resultados esse fungicida foi excluído das demais avaliações de ação em formigueiros de *Atta sexdens* com aplicação de nebulização e iscas impregnadas.



**Figura 23.** Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens*, submetidas ao bioensaio de ingestão de dieta artificial com o ingrediente ativo Epoxiconazole em diferentes concentrações ( $P < 0,0001$ ).

Foi realizado um segundo bioensaio *in vitro* de toxicidade com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole, devido aos resultados positivos apresentados na concentração de 0,1% no primeiro bioensaio realizado.

A concentração 0,01 % apresentou curva de sobrevivência semelhante ao tratamento controle, as demais concentrações 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 e 0,2% mostraram efeito tóxico por ingestão em formigas operárias de *Atta sexdens*, se comportaram como inodoros e não repelentes, mostrando ser potenciais no controle de formigas em condições laboratoriais (Figura 24).



**Figura 24.** Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens*, submetidas ao bioensaio de ingestão de dieta artificial com mistura dos ingredientes ativos Piraclostrobina + Metconazole em diferentes concentrações ( $P < 0,0001$ ).

Em pesquisas realizadas com formigas-cortadeiras, em bioensaios semelhantes a este trabalho, mas com o óleo bruto de *Azadirachta indica* (Meliaceae), conhecido como Neen, foi registrada toxicidade para operárias de *Atta sexdens*, quando oferecido na forma de ingestão. Por outro lado, o óleo de Neen não apresentou efeito tóxico para as colônias incipientes de formigas quando aplicado em forma de nebulização, nem em forma de iscas granuladas, ou seja, apresentou toxicidade à formiga, mas não o suficiente para eliminar a colônia (SANTOS- OLIVEIRA, 2006).

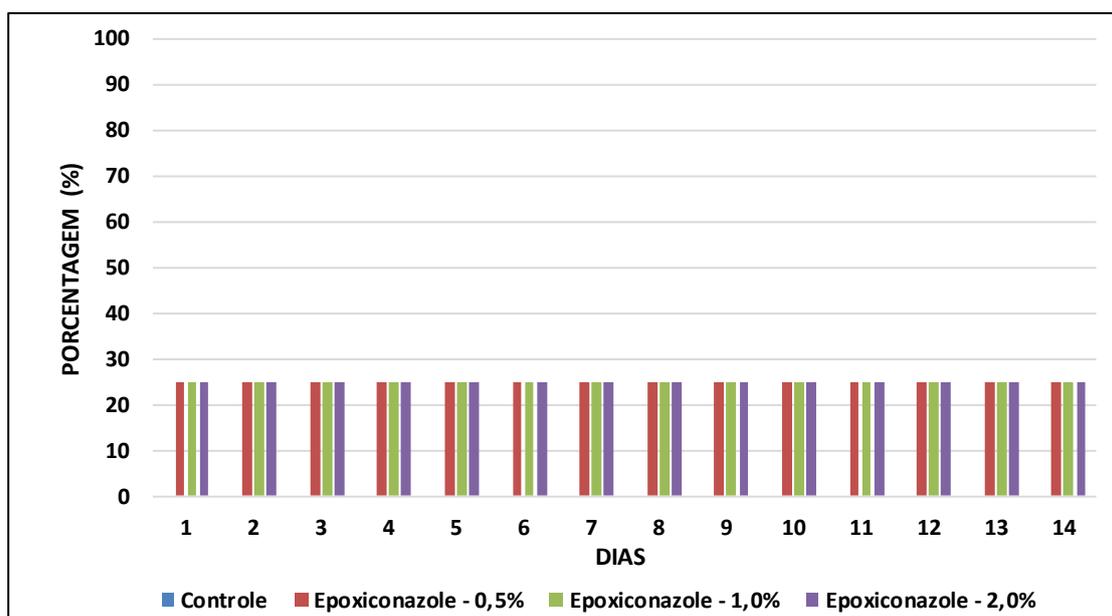
Não necessariamente resultados *in vitro* de laboratório refletem os mesmos resultados no campo, considerando-se que, no campo, o desafio se torna maior, devido, principalmente, às condições ambientais e complexidade biológica das formigas alvo. No entanto, resultados de laboratório, fornecem a base para elucidar as ações a serem tomadas na etapa posterior no campo (CARLOS, 2008).

A partir dos resultados apresentados nesse bioensaio *in vitro*, foram selecionadas as concentrações para realização do bioensaio de iscas impregnadas somente com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole que apresentaram resultados potenciais de ação inseticidas nas operárias de *Atta sexdens*.

### 5.3 Bioensaio de nebulização

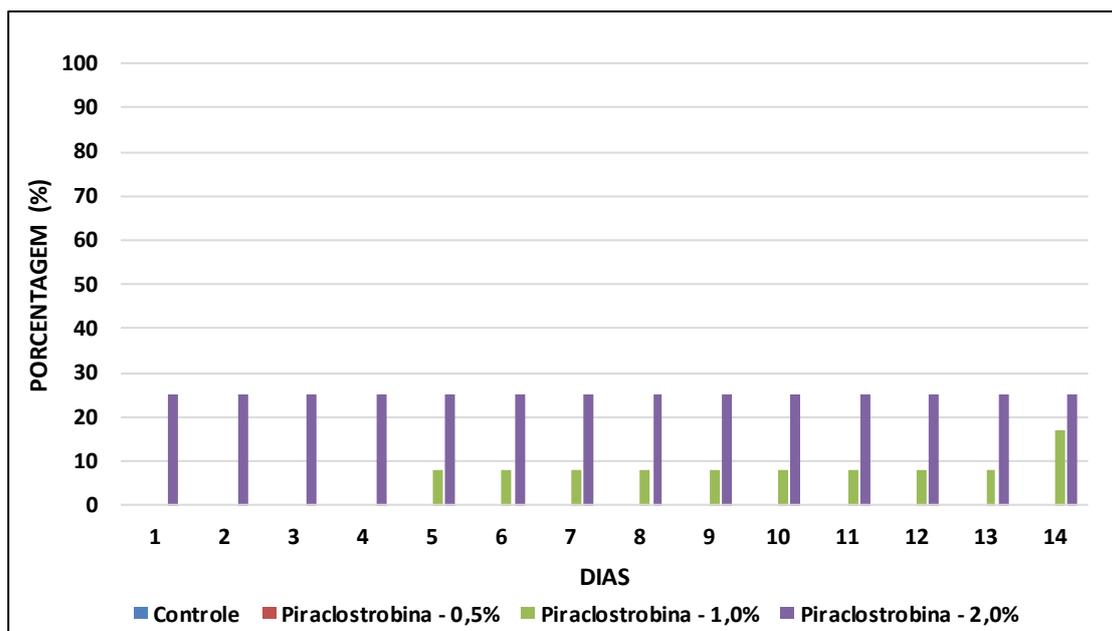
#### 5.3.1 Intoxicação das formigas por nebulização

Os formigueiros tratados no bioensaio de nebulização apresentaram poucos sintomas de intoxicação após o tratamento. Para o tratamento com o fungicida Epoxiconazole, todas as concentrações avaliadas (0,5, 1,0 e 2,0%), apresentaram até 25% de intoxicação para as colônias, sendo esse efeito mais evidente nas 24 horas após a aplicação do produto (Figura 25).



**Figura 25.** Intoxicação de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Epoxiconazole nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

Para o fungicida Piraclostrobina a intoxicação foi evidente apenas na maior concentração avaliada (2%), apresentando até 25% de intoxicação das operárias. Nas demais concentrações, a intoxicação foi muito baixa (Figura 26).

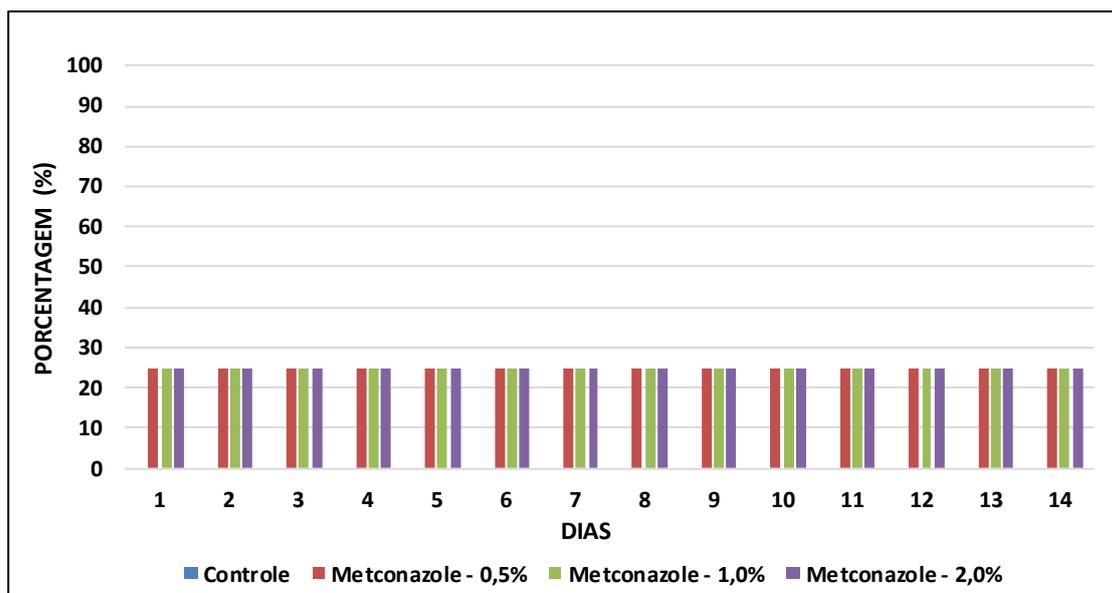


**Figura 26.** Intoxicação de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Piraclostrobina nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

Para o fungicida Metconazole nebulizado o efeito foi semelhante, apresentando até 25% de intoxicação para as colônias acompanhadas durante os dias avaliados, sendo que as operárias apresentavam poucos movimentos, principalmente 24 horas após a aplicação do fungicida (Figura 27).

Para SANTOS-OLIVEIRA (2006) nos bioensaios de nebulização com os óleos brutos de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *A. indica*, *Carapa guianensis* (Meliaceae), *S. indicum* e *Elaeis guineensis* (Arecaceae) não foram verificados sintomas de intoxicação nas operárias. As operárias ficaram agitadas durante a aplicação e transportaram as crias para outros locais do jardim de fungo, porém, após 24 horas da aplicação, esse comportamento havia desaparecido.

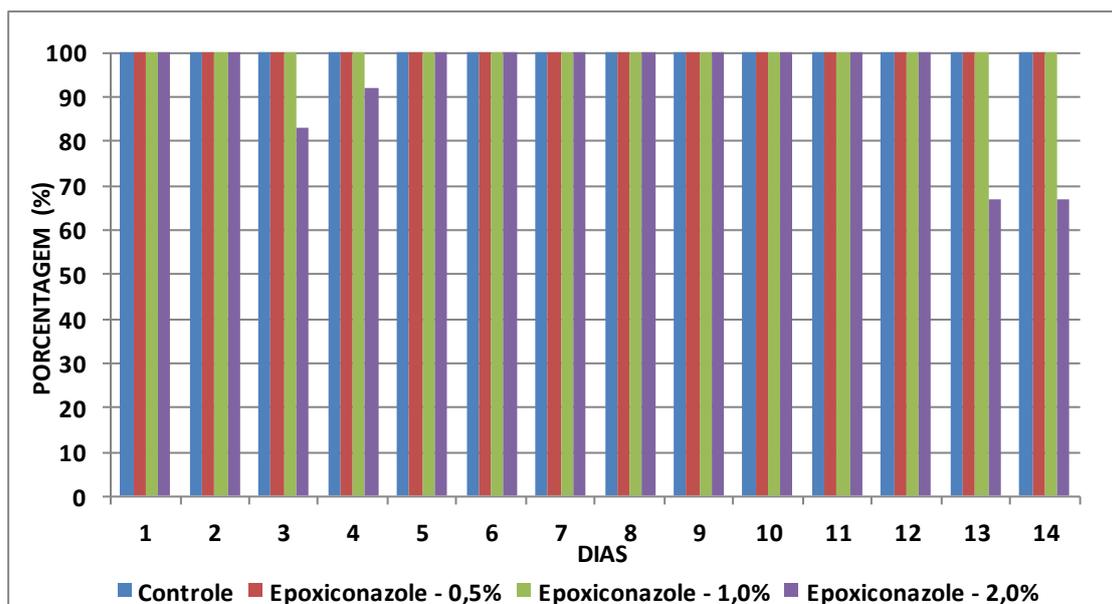
Em metodologia semelhante com extrato de *Rauia* sp. (Rutaceae), observou-se comportamento semelhante das operárias de *Atta sexdens*, sendo a intoxicação evidente apenas após 24 horas da aplicação e, após isso, esse comportamento desapareceu (FREITAS, 2010).



**Figura 27.** Intoxicação de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Metconazole nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

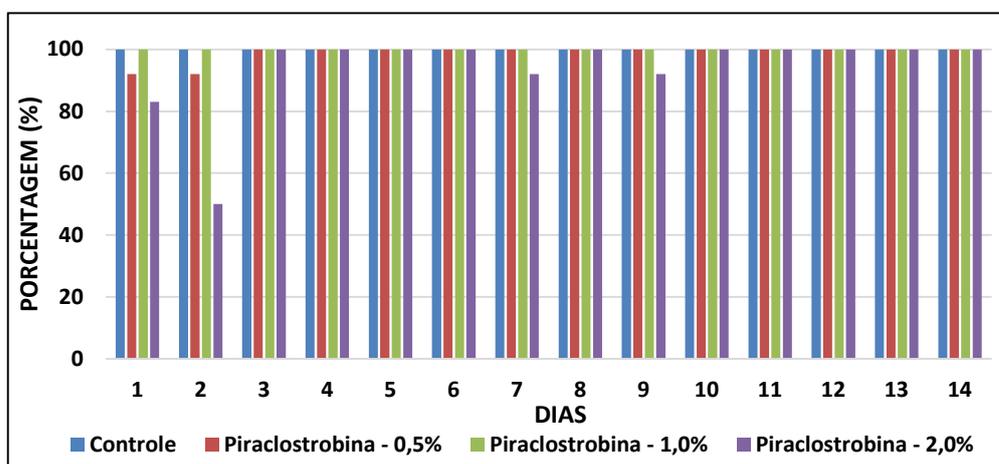
### 5.3.2 Corte de folhas

Para a avaliação do corte de folhas pelas formigas a partir das 24 horas do seu oferecimento, após os ensaios de nebulização, observa-se que, para o fungicida Epoxiconazole, o corte de folhas foi de 100% para as concentrações de 0,5% e 1,0% durante os 14 dias avaliados, porém para a maior concentração avaliada (2%), o corte de folhas foi reduzido a cerca de 60% por ter ocorrido a mortalidade de uma das repetições no 13º dia de avaliação (Figura 28).



**Figura 28.** Corte de folhas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Epoxiconazole nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

Para o fungicida Piraclostrobina nebulizado a porcentagem de corte de folhas foi acima de 90% para as concentrações de 0,5%, e 1% em todos os dias avaliados. Somente a concentração de 2%, nos dois primeiros dias, apresentou uma redução no corte de folhas devido a intoxicação inicial, porém conseguiu ir se recuperando durante os 14 dias de avaliação (Figura 29).

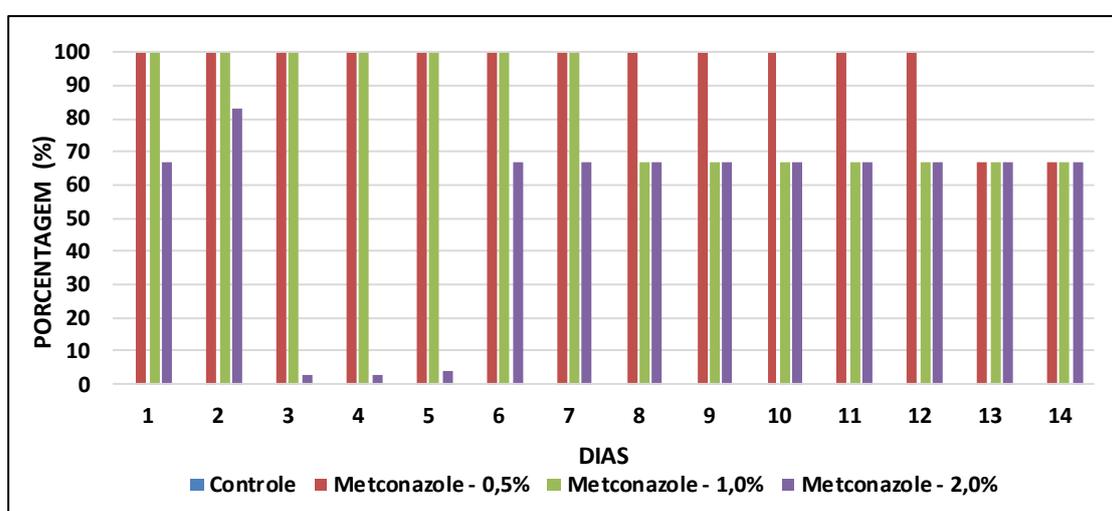


**Figura 29.** Corte de folhas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Piraclostrobina nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

Já para o fungicida Metconazole nebulizado foi observada a redução do corte de folhas no decorrer dos dias avaliados, devido a mortalidade de uma das repetições para cada

concentração avaliada. Para a concentração 0,5% houve mortalidade de uma das repetições no 13º dia, já para a concentração de 1% a mortalidade de uma das repetições ocorreu no 8º dia e para a concentração de 2%, houve a mortalidade de uma das repetições no 9º dia. Os demais formigueiros avaliados neste tratamento conseguiram se recuperar no decorrer das avaliações com o aumento no corte de folhas (Figura 30).

Segundo FREITAS (2010) também foi observada a redução de corte de folhas logo após a nebulização com extratos brutos diclorometânicos de folhas e caule de *Rauia* sp., porém houve a recuperação e aumento no corte de folhas durante a avaliação do experimento mostrando que mesmo havendo uma ação inicial, esta não foi suficiente para que causasse a morte total dos formigueiros.



**Figura 30.** Corte de folhas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Metconazole nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

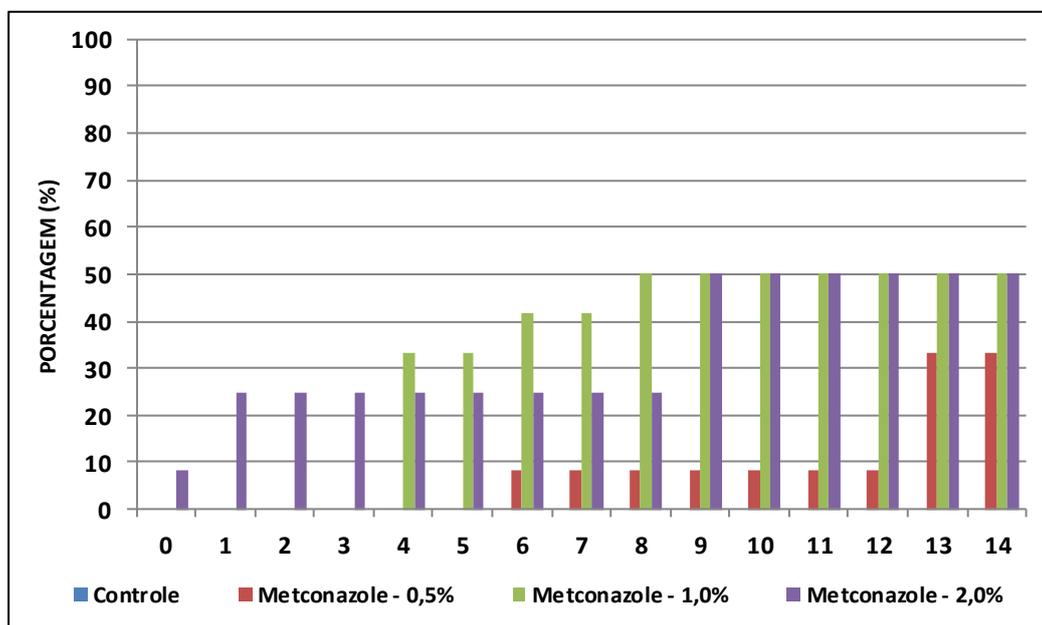
### 5.3.3 Mortalidade das formigas

A mortalidade de formigas variou para cada fungicida avaliado. Para o fungicida Epoxiconazole não foi observada mortalidade de operárias durante as avaliações realizadas.

Para o fungicida Metconazole nebulizado na concentração de 0,5% houve mortalidade de cerca de 8,3% a partir do 6º dia de avaliações das formigas, chegando a 33,3% de mortalidade no 13º dia quando houve a mortalidade de 100% das operárias de uma das repetições do tratamento. Para a concentração 1% a mortalidade iniciou a partir do 4º dia com 33,3% totalizando 50% de mortalidade até o 8º dia quando houve a mortalidade de 100% das operárias de uma das repetições do tratamento.

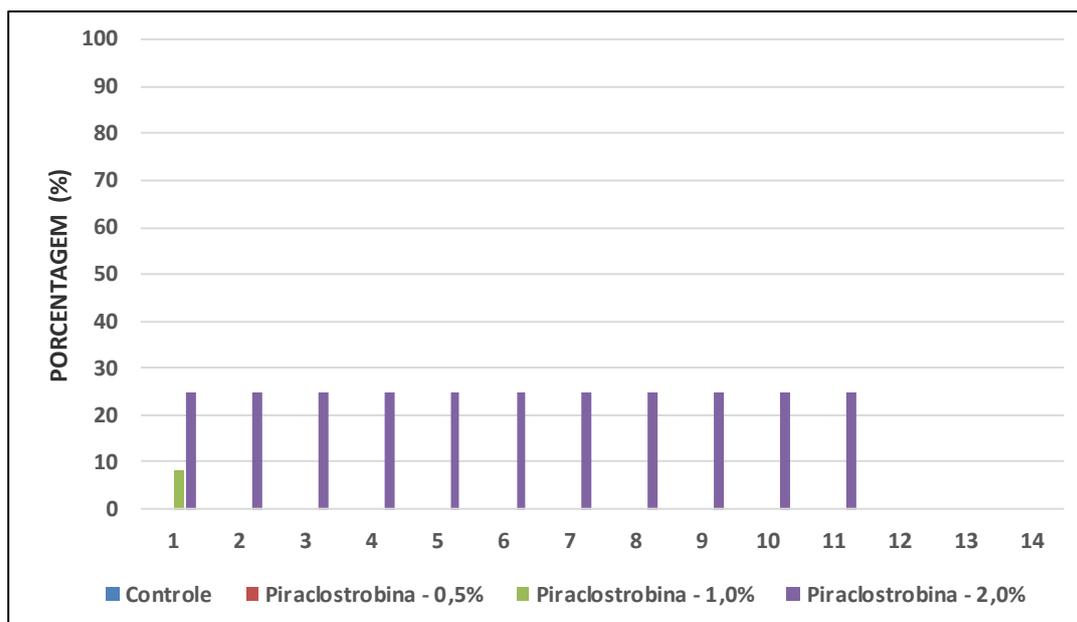
Para a concentração de 2% a mortalidade das formigas foi maior em relação a outras concentrações avaliadas, iniciando logo no primeiro dia de avaliação

apresentando baixa mortalidade de formigas em todas as repetições do tratamento e chegando a 50% de mortalidade no 9º dia quando houve a mortalidade de 100% das operárias de uma das repetições (Figura 31).



**Figura 31.** Mortalidade de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Metconazole nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

Para o fungicida Piraclostrobina nebulizado não foi observada mortalidade das formigas na menor concentração (0,5%). Para a concentração 1% houve baixa mortalidade no primeiro dia logo após o tratamento, porém os formigueiros conseguiram se recuperar no decorrer das avaliações. Para a concentração de 2% houve mortalidade de 25% das formigas até o 11º dia, porém mesmo com baixa mortalidade em todas as repetições, os formigueiros conseguiram se recuperar até o final das avaliações (Figura 32). Utilizando uma metodologia semelhante ao presente trabalho, BUENO (2002) observou uma mortalidade significativa de formigas nos bioensaios com *Cedrela fissilis*, indicando a presença de substâncias tóxicas nesta planta. FREITAS (2010) observou comportamento semelhante a esse trabalho, no tratamento com extratos brutos diclorometânicos, houve a mortalidade inicial de 25% das operárias no dia seguinte a aplicação por nebulização, depois os ninhos se recuperaram.



**Figura 32.** Mortalidade de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Piraclostrobina nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

#### 5.3.4 Mortalidade da rainha

Não ocorreu mortalidade da rainha para o fungicida Piraclostrobina nebulizado nas concentrações de 0,5, 1 e 2%, e nas colônias do tratamento controle. Para o fungicida Epoxiconazole houve mortalidade da rainha em apenas uma das repetições, na maior concentração avaliada de 2%. Para o fungicida Metconazole houve mortalidade de uma das repetições para todas as concentrações avaliadas 0,5, 1 e 2%. Segundo Boaretto e Forti (1997) mesmo com a colônia desestruturada e a morte das operárias, a rainha ainda pode sobreviver por até 40 dias, o que não ocorreu neste bioensaio, onde as colônias que morreram durante o experimento também apresentaram a mortalidade da rainha, o que mostra que a contaminação com o fungicida chegou até elas.

#### 5.3.5 Colônias com mudança de panelas

Para o tratamento com os fungicidas Metconazole e Epoxiconazole nebulizados, não houve mudança de panela em todas as concentrações e repetições avaliadas. Para o fungicida Piraclostrobina houve mudança de panela em pelo menos uma repetição em cada concentração avaliada (0,5, 1,0 e 2,0%) mostrando que o fungicida após aplicado com nebulização causou uma ação tóxica e fez com que as formigas transferissem o fungo e as crias para a panela de alimentação na tentativa de salvar o formigueiro (Figura 33). Esse comportamento já foi relatado anteriormente. Segundo BUENO

(2005) quando as operárias percebem a presença de ingredientes ativos tóxicos, elas podem isolar suas crias em pedaços do fungo sadio do restante do ninho, que está contaminado, na tentativa de evitar que toda a colônia morra devido ao contato com os ativos.



**Figura 33.** Colônia de *Atta sexdens* com mudança de parte do ninho para a panela de alimentação no tratamento de Piraclostrobina 2% após 72 horas do tratamento com nebulização (seta vermelha).

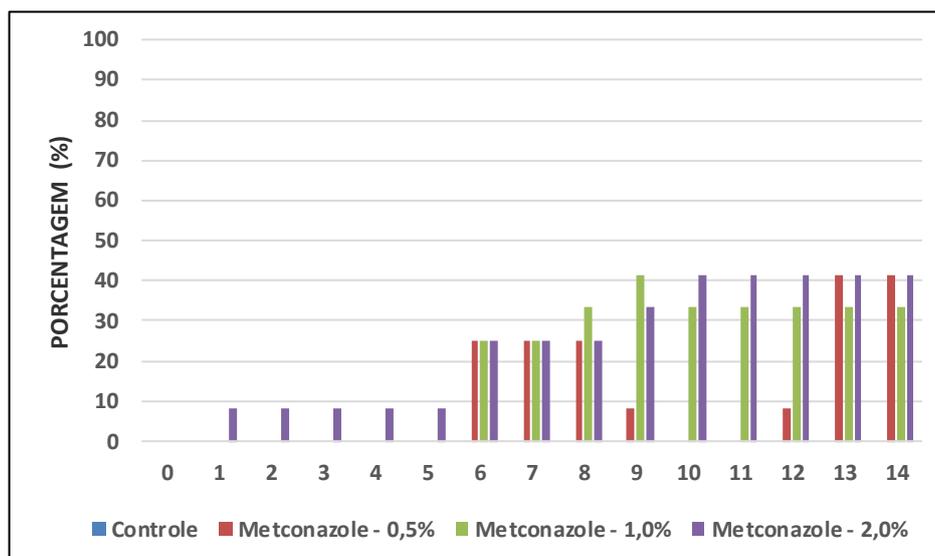
### 5.3.6 Avaliação sobre a presença de fungo filamentoso

Em todos os fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole, e em todas as concentrações avaliadas, não foi observada a presença de fungos filamentosos, acreditando-se que os fungicidas podem ter inibido o crescimento desses fungos para os tratamentos e doses avaliadas. A presença de fungos filamentosos como *Escovopsis* sp., que são parasitas antagonistas do fungo simbiote das formigas-cortadeiras, causa grandes impactos nas condições de sobrevivência dos ninhos, pois diminuem a taxa de crescimento do fungo simbiote e reduzem a sobrevivência das formigas (CURRIE, 2001a, 2001b).

### 5.3.7 Corte de fungo

Para o tratamento com o fungicida Epoxiconazole nebulizado não houve corte do fungo em todas as concentrações e repetições avaliadas, assim como para o tratamento controle. Esse comportamento pode indicar que as formigas consideram parte do fungo simbiote como inviável para alimentação, pela presença de substância tóxica por exemplo, e descartam essa porção de fungo como lixo (FREITAS, 2010).

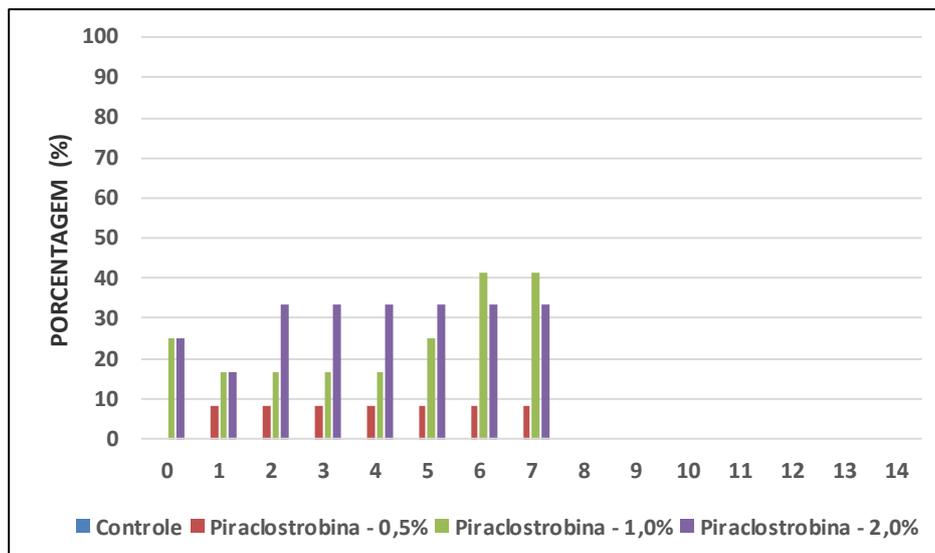
Para o fungicida Metconazole nebulizado houve corte de fungo para a maior concentração avaliada (2%) a partir do primeiro dia (8,3%) após a nebulização do fungicida. Esse comportamento foi observado devido as formigas terem detectado algo diferente no fungo simbiote descartando-o na panela de lixo. A porcentagem de corte de fungo chegou a 41,6% até o último dia de avaliação, onde pelo menos um dos formigueiros havia morrido. Para as menores concentrações avaliadas (0,5 e 1%) houve corte de 25% do fungo a partir do sexto dia, porém, mesmo assim, um formigueiro de cada tratamento morreu até o final das avaliações e as demais repetições desses tratamentos conseguiram se recuperar (Figura 34).



**Figura 34.** Fungo cortado em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Metconazole nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

Para o fungicida Piraclostrobina nebulizado, houve grande corte inicial do fungo nas maiores concentrações avaliadas (1,0 e 2%), porém a partir do oitavo dia todos os formigueiros conseguiram se recuperar e não houve mais corte e descarte do fungo simbiote no lixo, o que mostra que as formigas conseguiram retirar todo o fungo

que elas julgaram contaminado e conseguiram recuperar os formigueiros (Figura 35).



**Figura 35.** Fungo cortado em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com nebulização do fungicida Piraclostrobina nas concentrações 0,5%, 1,0% e 2%.

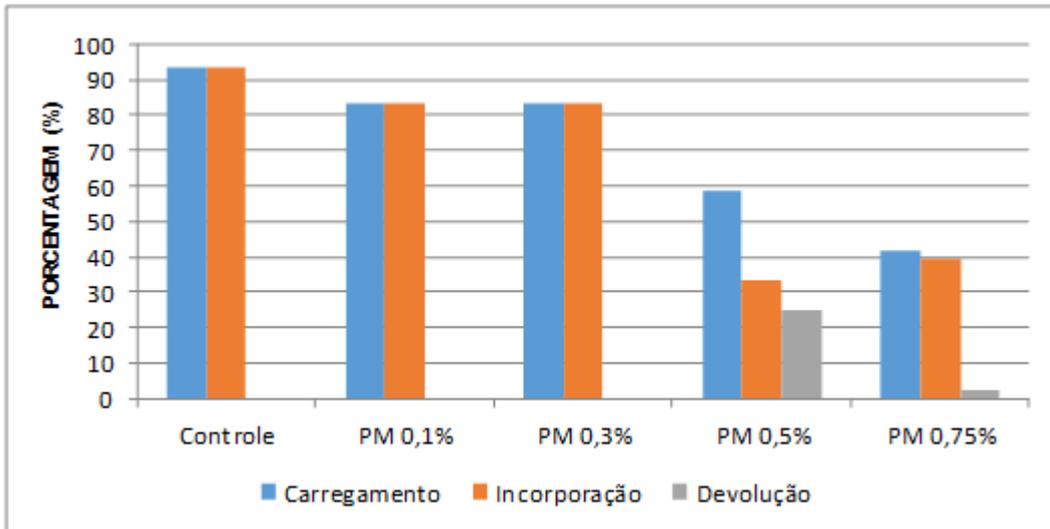
## 5.4 Bioensaio com iscas impregnadas

### 5.4.1 Quantificação do carregamento, incorporação e devolução das iscas

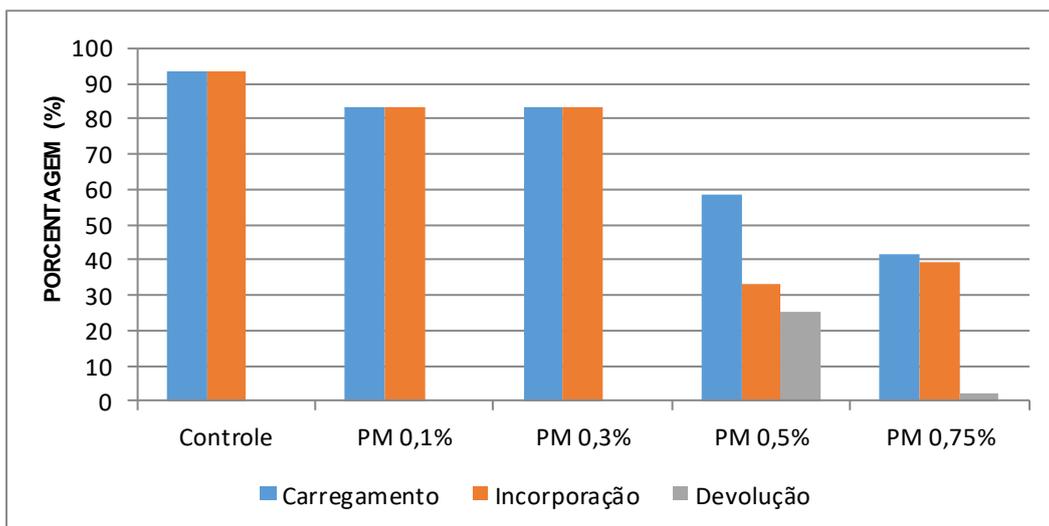
O carregamento das iscas, 24 horas após oferecimento na câmara de alimentação, com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole (PM) nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75% não foi total, apresentando um máximo de 83,33% para os tratamentos nas concentrações de 0,1% e 0,3%; 58,33% de carregamento para o tratamento nas concentrações de 0,5% e 41,66% de carregamento para o tratamento na concentração de 0,75%. Os tratamentos nas concentrações de 0,5% e 0,75%, apresentaram devolução da isca de 25% e 8,33%, respectivamente. Os tratamentos nas concentrações 0,1% e 0,3% não apresentaram devolução de iscas (Figuras, 36 a 38). No controle, o carregamento e incorporação da isca foi de 93,3% e não houve devolução de isca.

A devolução de iscas também foi registrada nos experimentos de BUENO (2005), onde 40% das iscas Dinagro-S também deixaram de ser incorporadas, sendo devolvidas na câmara de lixo ainda nos primeiros dias do experimento. Para SANTOS-OLIVEIRA (2006) não houve devolução das iscas carregadas contendo óleos brutos de *A. occidentale*, *A. indica* e *E. guineenses*.

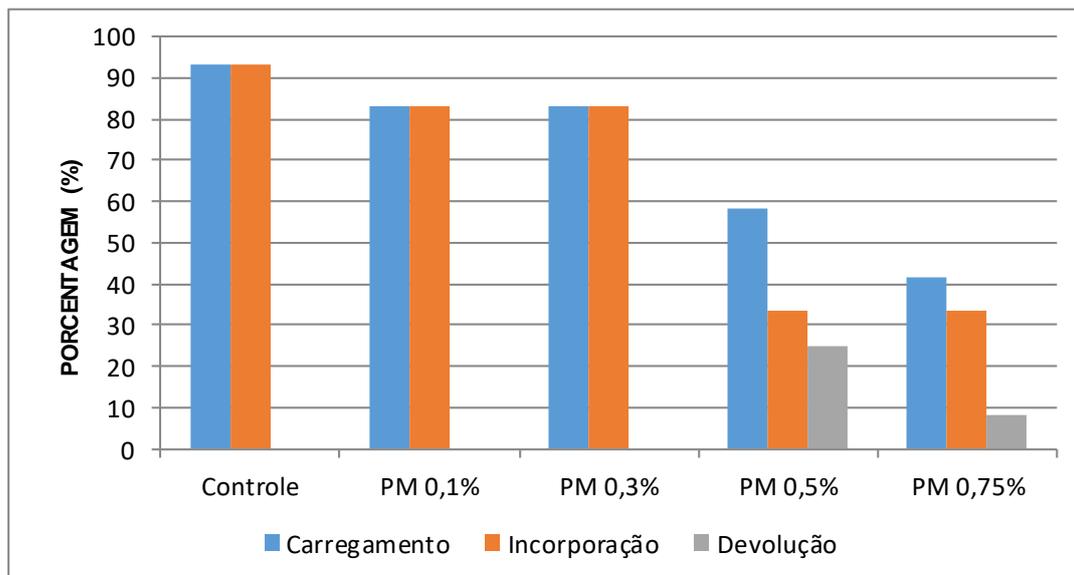
Segundo LOFGREN et al. (1962) e STRINGER et al. (1964), para controlar as formigas-cortadeiras, o inseticida formulado em isca tóxica deve agir por ingestão e ter a mesmas características dos inseticidas que atuam em operárias de *Solenopsis* spp., ou seja, que possua ação tóxica com mortalidade inferior a 15% após o primeiro dia e superior a 89% até o final do experimento, ser letal em baixas concentrações, ser prontamente espalhado na colônia e matar os indivíduos receptores e não danificar o meio ambiente.



**Figura 36.** Carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução de iscas Piraclostrobina + Metconazole (PM) e o grupo controle, após 24 horas do oferecimento das iscas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório



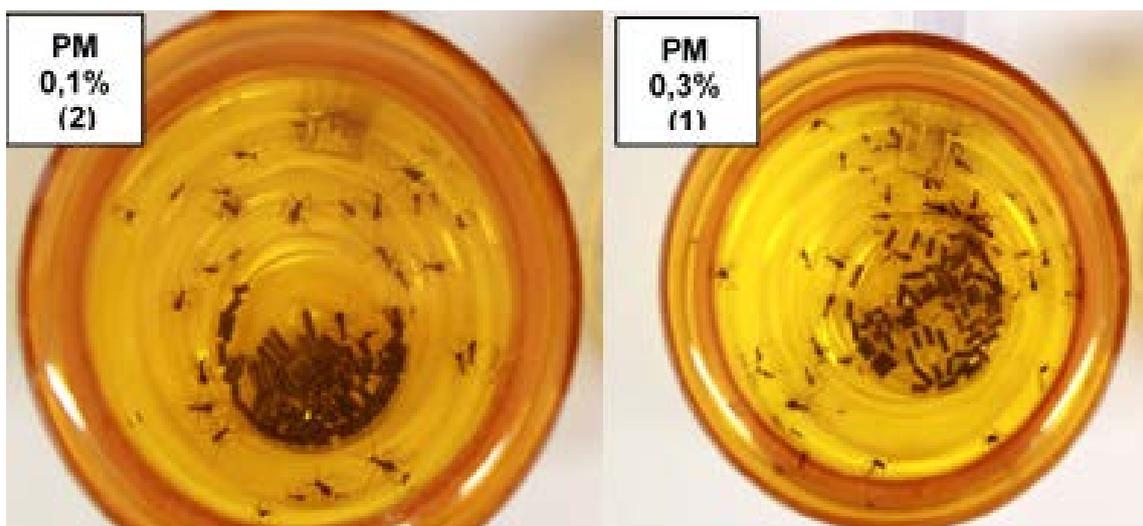
**Figura 37.** Carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução de iscas Piraclostrobina + Metconazole (PM) e o grupo controle, após 48 horas do oferecimento das iscas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório.



**Figura 38.** Carregamento, incorporação no jardim de fungo e devolução de iscas Piraclostrobina + Metconazole (PM) e o grupo controle, após 72 horas do oferecimento das iscas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório.

Nos tratamentos Piraclostrobina + Metconazole 0,1% e 0,3%, apenas uma colônia de cada concentração não incorporou 16,7% das iscas (Figura 39). Já no tratamento Piraclostrobina + Metconazole a 0,5% duas colônias não carregaram as iscas por completo, representando 41,67% de sobra (Figura 40) e na concentração 0,75% as três colônias juntas deixaram de carregar 58,34% das iscas (Figura 41). No controle apenas uma colônia não carregou a isca por completo, representando 6,67% de sobra (Figura 42).

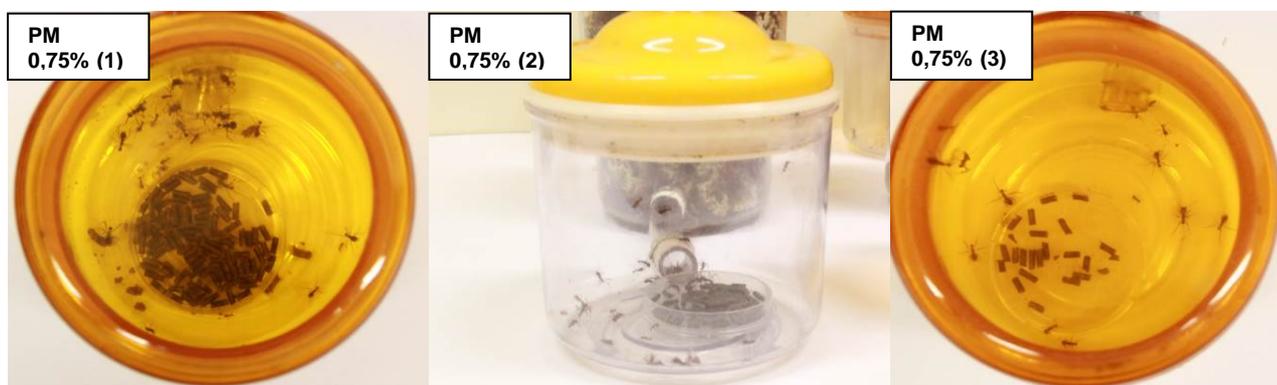
O carregamento da isca por completo e espalhamento pela colônia é um fator importante para que haja tempo do ingrediente ativo agir, sendo que a devolução da isca pode ser um sinal de que o formigueiro percebeu uma substância diferente que pode ameaçar o ninho. A propagação de ingredientes ativos em espécies do gênero *Solenopsis* e muitas outras espécies de formigas ocorre por trofalaxia, isto é a troca de alimento líquido entre as operárias. No entanto, segundo NAGAMOTO et al. 2004, estudos morfológicos e comportamentais mostraram que este comportamento de transferência de alimento, não ocorre em grandes proporções com formigas-cortadeiras. Assim, conclui-se que o espalhamento do ingrediente ativo nas colônias ocorre principalmente de outras formas, como o contato direto das operárias com a isca ou o carregamento da isca pela operária que por sua vez, entrega para as jardineiras que manipulam e incorporam ao fungo (NAGAMOTO et al., 2004).



**Figura 39:** Vista das câmaras de forrageamento em uma colônia de cada tratamento Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,1% e 0,3%, ambas com 16,7% de sobras de iscas e com suas respectivas colônias numeradas.



**Figura 40:** Vista das câmaras de forrageamento das colônias 1 e 3 do tratamento Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,5% com 41,67% de sobras de iscas.

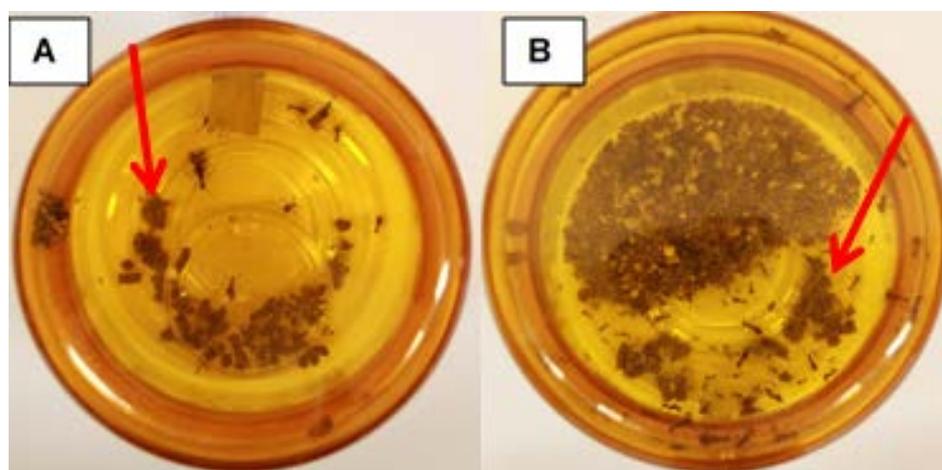


**Figura 41:** Vista das câmaras de forrageamento das colônias 1, 2 e 3 do tratamento Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,75% somando 58,34% de sobras de iscas.

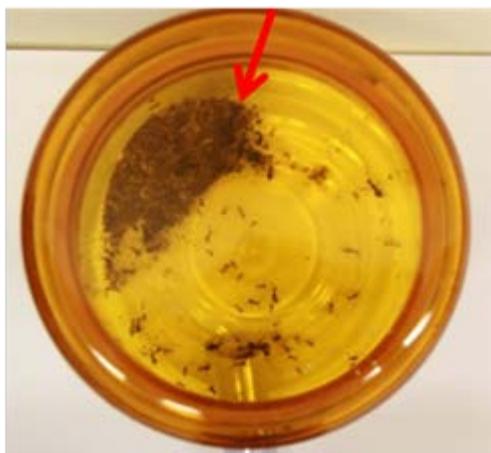


**Figura 42:** Vista da câmara de forrageamento da colônia 1 do controle com 6,67% de sobras de iscas.

Além das sobras de iscas citadas anteriormente, os tratamentos 0,5% e 0,75%, respectivamente apresentaram devolução da isca, tendo sido registrado 25% e 8,33% de devolução, respectivamente. Na colônia 2 do tratamento 0,5% houve devolução de isca nas câmaras de forrageamento e câmara de lixo (Figura 43). Na colônia 3 do tratamento 0,75% houve 8,33% de devolução de iscas (Figura 44).



**Figura 43:** Câmara de forrageamento (A) e câmara de lixo (B) da colônia 2 do tratamento Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,5% após 24 horas de exposição às iscas, contendo 25% de devolução de iscas (seta vermelha).

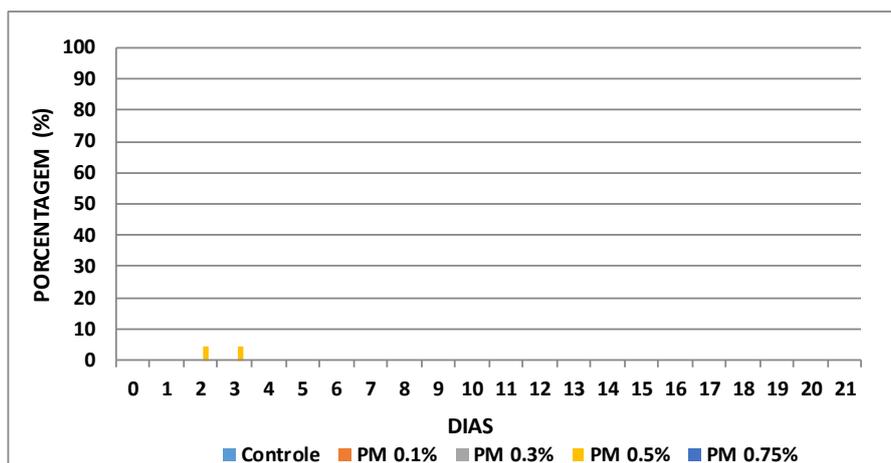


**Figura 44:** Câmara de lixo da colônia 3 após 72 horas de exposição às iscas no tratamento Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,75%, contendo 8,33% de devolução de iscas (seta vermelha).

#### **5.4.2 Intoxicação das formigas:**

Segundo MARIN (2014) colônias tratadas com iscas contendo ingredientes ativos inseticidas, apresentam vários sinais de intoxicação, como dificuldade de locomoção, tremores nas pernas e imobilidade. Desta forma, bioensaios com fungicidas, podem também revelar situação semelhante.

No segundo dia de avaliação deste bioensaio, 4,16% das operárias tratadas com iscas Piraclostrobina + Metconazole na concentração 0,5% apresentaram sintomas de intoxicação, principalmente dificuldade de locomoção, visto que poucas operárias andavam com as pernas espaçadas, enquanto que outras apresentavam aspecto de fracas. Observou-se também que no 4º dia de experimento, essas operárias já estavam mortas, considerando que as formigas que entraram em contato com a isca foram as mais afetadas e morreram mais rapidamente no decorrer do bioensaio. Nenhuma das colônias do controle e das concentrações Piraclostrobina + Metconazole 0,1, 0,3 e 0,75% apresentaram formigas com tais sintomas (Figura 45).

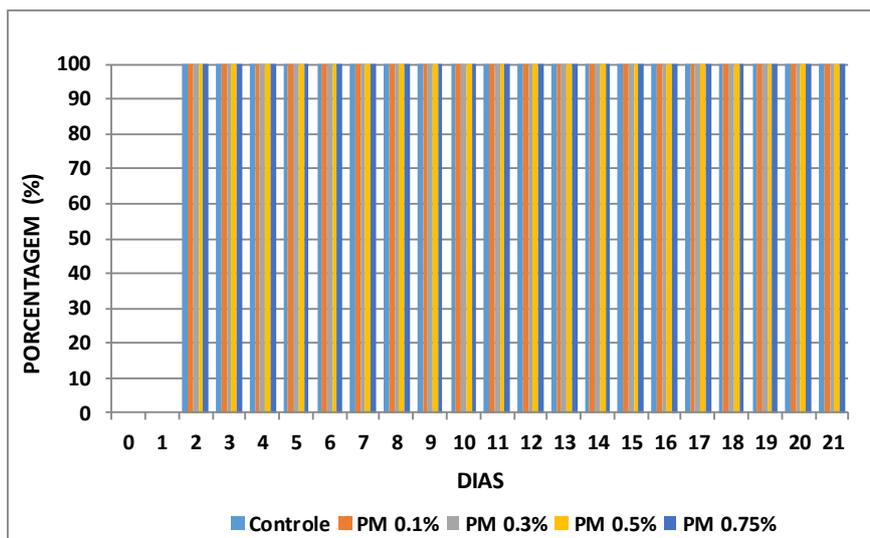


**Figura 45.** Intoxicação de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com iscas Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,1%; 0,3%; 0,5% e 0,75%.

### 5.4.3 Corte de folhas:

Em todas as colônias das concentrações de iscas impregnadas avaliadas e no controle, o corte de folhas foi constante (100%), desde o primeiro dia de experimento, não sendo observada redução no corte de folhas pelas formigas no decorrer das avaliações comportamentais realizadas durante o experimento. Tais resultados demonstram que as iscas impregnadas com os fungicidas não afetaram as atividades das colônias (Figura 46). Em experimento realizado por SANTOS-OLIVEIRA (2006), houve comportamento semelhante não havendo interrupção no corte de folhas após o tratamento com iscas contendo óleos brutos de *A. occidentale*, *A. indica* e *E. guineenses*.

Segundo BUENO (2013) formigas tratadas com iscas inseticidas Mirex-S Max® (Sulfluramida 0,02%) interromperam o corte de folhas imediatamente, mostrando ter ocorrido intoxicação nos formigueiros.



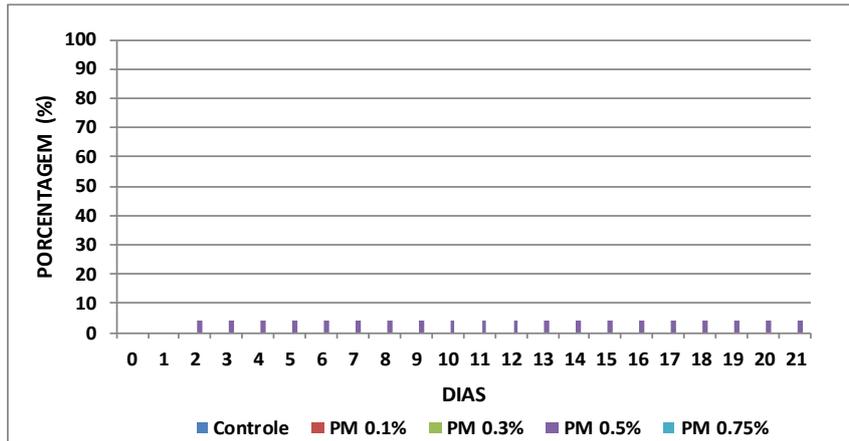
**Figura 46.** Corte de folhas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com iscas contendo Piraclostrobina + Metconazole (PM) nas concentrações 0,1%; 0,3%;0,5% e 0,75%.

#### 5.4.4 Mortalidade de formigas:

A partir do 2º dia de experimento que as colônias foram expostas a iscas Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,5%, foi registrado 4,16% de mortalidade das formigas, e se manteve assim até o final do período, como representado na figura 47.

No controle e nas concentrações de PM 0,1%; 0,3% e 0,75% não houve mortalidade das formigas no decorrer do experimento.

Em trabalho realizado com metodologia semelhante por BUENO (2013), colônias tratadas com iscas de polpa cítrica, não apresentaram mortalidade de formigas no controle e nos tratamentos com iscas de diafentiurom, enquanto que para as iscas Mirex-S Max® a mortalidade ocorreu a partir do terceiro dia do experimento e a mortalidade total ocorreu no sexto dia. Segundo MARIN (2014) colônias tratadas com isca de sulfluramida, a mortalidade começou a ocorrer a partir do segundo dia e, após o terceiro dia, a maioria das formigas já estava mortas.

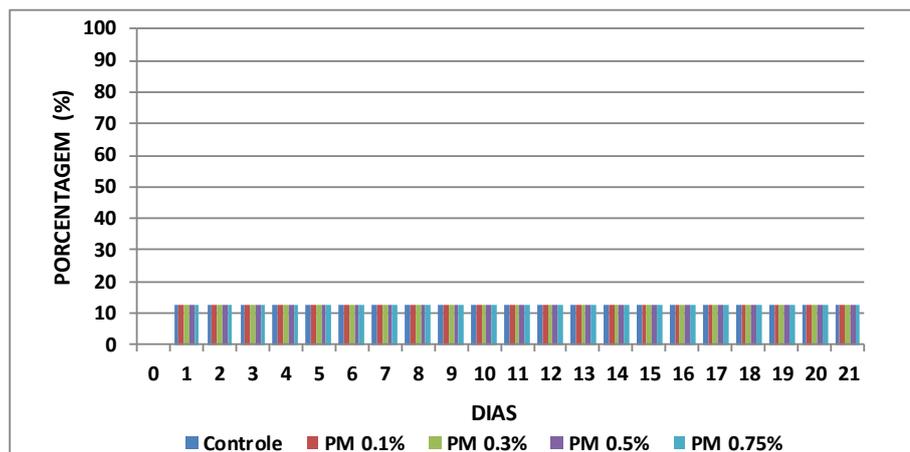


**Figura 47.** Mortalidade de formigas em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com iscas contendo Piraclostrobina + Metconazole (PM) nas concentrações 0,1%; 0,3%;0,5% e 0,75%

#### 5.4.5 Corte do fungo

Todas as colônias tratadas com iscas com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75% e o controle apresentaram 12,5% de corte do fungo simbiote e descarte do mesmo na panela de lixo, a partir do 1º dia de avaliação e durante todo o experimento (Figura 48).

Esse comportamento não foi observado por BUENO (2013), onde nos tratamentos com iscas avaliados não foi observado o corte do fungo durante a realização do experimento. Segundo MARIN (2014), em colônias tratadas com iscas de hidrametilnona, o corte do fungo começou somente após o segundo dia, quando as operárias começaram a abandonar as atividades de manipulação dos grânulos da isca e passaram a cortar pedaços do fungo, carregando-os para a câmara de lixo. Esse comportamento ocorreu na tentativa de eliminar pedaços de fungo contaminados e também descartar pedaços de fungos mortos da colônia.



**Figura 48.** Porcentagem de fungo cortado pelas operárias em colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório e tratadas com iscas de Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,1%; 0,3%; 0,5% e 0,75%.

#### 5.4.6 Mudança de panela:

Não houve tentativa de isolamento e mudança do jardim de fungo ou das formas imaturas para outras câmaras nas colônias controle e com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75%, durante o período de avaliação. Em trabalho realizado por BUENO (2013) também não foi observada a mudança de panela de fungo em iscas contendo diafentiurom e iscas Mirex-S Max®. Mesmo comportamento observado por SANTOS-OLIVEIRA (2006) utilizando iscas contendo os óleos brutos de *A. occidentale*, *A. indica* e *E. guineenses*.

#### 5.4.7 Contaminação com fungo branco e/ou outro tipo de fungo:

Nos tratamentos controle e Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75% não foram observados a presença de fungo branco e/ ou outro tipo de fungo no decorrer das avaliações realizadas. Os fungos do gênero *Escovopsis* são anamórficos (isto é, apresentam apenas a fase assexuada de reprodução), sendo encontrados em quase todos os jardins de formigas Attini (CURRIE et al., 1999b). Quando presentes, esses fungos podem causar diminuição no acúmulo de biomassa do jardim, diminuição da produção de pupas, larvas e operárias, levando a um atraso no crescimento da colônia (CURRIE, 2001b). Em trabalhos já realizados com extrato de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), fungos filamentosos foram verificados nas colônias tratadas e esse aparecimento se deve provavelmente ao enfraquecimento das

barreiras de defesa da colônia e a debilitações ocasionadas pela aplicação desse tratamento (SANTOS-OLIVEIRA, 2006).

Esse comportamento já havia sido evidenciado no experimento com a nebulização dos fungicidas. Isso pode ter ocorrido devido a ação dos fungicidas nos fungos filamentosos que inibiu o crescimento dos mesmos.

#### **5.4.8 Rainha morta:**

Não ocorreu mortalidade da rainha nos tratamentos com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75%, e nas colônias do tratamento controle. Em trabalho realizado por BUENO (2013) com formigas-cortadeiras da mesma espécie também não houve a mortalidade das rainhas durante a avaliação do experimento com iscas inseticidas contendo diafentiurom e a isca Mirex-S Max®. Para SANTOS-OLIVEIRA (2006), também não houve mortalidade de rainhas nas colônias tratadas com iscas contendo óleos brutos de *A. occidentale*, *A. indica* e *E. guineenses*.

#### **5.4.9 Condições da colônia:**

As colônias que receberam as iscas controle e as iscas com a mistura dos fungicidas Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75%, incorporaram o material no jardim de fungo e não sofreram nenhuma alteração nas colônias até o término do experimento. Portanto, mesmo a concentração 0,5% ter demonstrado 4,16% de intoxicação e mortalidade de formigas, ela não ocasionou alterações nas mudanças no aspecto do jardim de fungo e nem no corte das folhas pelas formigas (Tabela 3).

Outros produtos já avaliados como o óleo bruto da planta *A. occidentale*, resultaram em efeito tóxico para a formiga *Atta sexdens*, tanto na forma de ingestão, quanto na de aplicação tópica; porém esse óleo não se mostrou tóxico quando foi incorporado em iscas granuladas em experimentos anteriores. Quando aplicado em bioensaios, sobre a forma de nebulização, o óleo bruto causou um aumento na mortalidade das operárias, assim como o extrato bruto diclorometânico de *Rauia* sp. (Rutaceae) (SANTOS-OLIVEIRA, 2006).

**Tabela 3:** Avaliação diária das condições das colônias de *Atta sexdens* tratadas com iscas controle e Piraclostrobina + Metconazole (PM) 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75% no decorrer dos 21 dias de avaliações. Classificação feita como: 0 - colônia 100% morta; 1 - alteração de 75% das atividades da colônia; 2 - alteração de 50% das atividades da colônia; 3 - alteração de 25% das atividades da colônia e; 4 - colônia em perfeitas condições ou 0% de alteração nas atividades.

TRATAMENTO	DIAS DE EXPOSIÇÃO ÀS ISCAS																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>Controle</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>PM 0,1%</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>PM 0,3%</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>PM 0,5%</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>PM 0,75%</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

A descoberta de novos ingredientes ativos para serem utilizados em iscas tóxicas no controle de formigas-cortadeiras não é um processo fácil (FORTI et al., 1993). No período de 1989 a 1993, 90% das substâncias testadas no controle de formigas do gênero *Atta* apresentaram 0% de eficiência e outros 10% apresentaram eficiência menor que 40%.

Embora seja desejável que outros métodos e produtos sejam desenvolvidos e utilizados no controle químico de formigas-cortadeiras, atualmente, o uso de isca tóxica com ingredientes ativos de ação retardada é suficiente, viável e eficaz. Contudo, é oneroso e demorado desenvolver novos ingredientes ativos ou produtos eficientes no controle de formigas-cortadeiras. No entanto, é digno de nota que é muito mais difícil desenvolver ingredientes ativos ou produtos para controlar as formigas-cortadeiras do que qualquer outra espécie de formiga. As causas desta grande dificuldade ainda estão longe de ser bem compreendidas, mas provavelmente estão relacionadas à associação simbiótica das formigas com seus fungos mutualistas e outros micro-organismos, devido à organização social e comportamento de limpeza (BRITTO et al., 2016).

Segundo BUENO (2013) foram avaliados mais de 40 ingredientes ativos por meio de bioensaios toxicológicos com operárias de *A. sexdens* isoladas dos formigueiros e nenhum deles apresentou toxicidade. Essa análise da toxicidade é uma primeira etapa para a avaliação do ingrediente ativo e não é um fator determinante para avaliar se a molécula é eficiente ou não para o controle de colônias.

Testes preliminares bem-sucedidos em laboratório, devem ser repetidos no campo, para que o produto funcione é necessário obter uma boa eficiência de pelo

menos 80% do controle de colônia em condições de campo, onde ocorrem colônias adultas (BRITTO et al., 2016). Por isso, novas pesquisas com novos ingredientes ativos e diferentes aplicações das substâncias avaliadas por meio de formulações como iscas, ou mesmo por nebulização faz-se necessária para poder avaliar outros fatores comportamentais que envolvem as colônias de formigas-cortadeiras.

## 6. CONCLUSÕES

Dos fungicidas avaliados inicialmente *in vitro* para verificação da inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo simbiote *L. gongylophorus*, das formigas-cortadeiras *Atta sexdens*, apenas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole apresentaram inibição de 100% de crescimento micelial nas concentrações de 10 e 100 ppm.

Os fungicidas Piraclostrobina e Metconazole apresentaram resultados de potencial ação inseticida em operárias de *Atta sexdens* na concentração de 0,1%. Na mistura dos mesmos fungicidas; todas as concentrações 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 e 0,2% mostraram efeito tóxico por ingestão em formigas operárias de *Atta sexdens* sendo potenciais no controle de formigas, em condições laboratoriais.

Os fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole aplicados por meio de nebulização nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, apresentaram resultados pouco satisfatórios no controle de formigueiros de *Atta sexdens* em laboratório.

Iscas contendo mistura de Piraclostrobina + Metconazole nas concentrações 0,1, 0,3, 0,5 e 0,75% não apresentaram mortalidade e alterações na dinâmica das colônias de *Atta sexdens* mantidas em laboratório.

Portanto, os fungicidas Piraclostrobina, Metconazole e Epoxiconazole mesmo apresentando resultado satisfatórios em fungo isolado *L. gongylophorus in vitro* e em operárias isoladas de *Atta sexdens*, mostraram não ser eficientes com aplicações de nebulização e iscas impregnadas em colônias mantidas em laboratórios tornando os mesmos inviáveis para utilização no controle de formigas-cortadeiras.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTI, D.; JOHNSON, N. F. **La nueva taxonomía de hormigas**. In: Fernández, F. (Ed.). *Introducción a las hormigas de la región neotropical*. Instituto Humboldt, Bogotá, p. 45–48, 2003.

AGOSTI, D.; JOHNSON, N. F. **Antbase**. World Wide Web electronic publication. [antbase.org](http://antbase.org), version (05/2005). Disponível em 20 de novembro 2015.

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

ARAÚJO, G. D. de F. T. **Incremento da Eficiência de iscas destinadas ao controle da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) mediante o uso de extrato de glândula de veneno e farinha foliar de gergelim**. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Goytacazes, 2011.

AUTUORI, M. **Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae)**. In: *Evolução do saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908)*. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.12, p.197-228, 1941.

AUTUORI, M. **Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.-Hymenoptera-Formicidae)**. II. O saúveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). Arquivos do Instituto Biológico. v.13, p.67-86, 1942.

BALARDIN, Ricardo. **Fungicidas sistêmicos: benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas**. Disponível em: <<https://phytusclub.com/materiais-didaticos/fungicidas-sistemicos-benzimidazois-triazois-e-estrobilurinas/>>. Data de acesso: 22 de junho de 2018.

BARBIERI, R. F.; FORTI, L. C.; FUJIHARA, R. T.; CARLOS, A. A. **Fluxo de corante e inseticida entre operárias de formigas-cortadeiras** - *Biológico*, v.69, p.375, São Paulo, 2007.

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

BORBA, R. S.; LOECKI, A. E.; BANDEIRA, J. M.; MORAES, C. L.; CENTENARO E. D. **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, 2006.

BOLTON, B.; ALPERT, G.; WARD, P.; NASKRECKI, P. **Bolton's Catalogue of the ants of the World: 1758–2005**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 2005.

BRANDAO, C. R. F. **Adendos Ao Catalogo Abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae)**. *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, v. 35, n.2, p. 319-412, 1991.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHE-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. **Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras**. In: DELLA LUCIA, T. M. C. *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: Ed. UFV. p. 27-48. 2011.

BRASIL. **Resolução nº41**, de 08 de janeiro de 2015. Dispõe sobre a Relação de monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 09 jan. 2015. Seção 1, nº 6, p.740.

BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J.C.; LOECK, A.E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N.S.; LEMES, P.G.; CAMARGO, R da S. **Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex***. *International Journal of Research in Environmental Studies*. ISSN 2059-1977. p.11-92.2016.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C. HEBLING, M. J. A. SILVA, O. A. **Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais.** An. Soc. Entomol. Bras., Londrina, v. 26, n. 1, Apr. 1997.

BUENO, F.C. **Toxicidade de extrato da planta *Cedrela fissilis* Vell. Para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae).** 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

BUENO, F.C. **Seleção de ingredientes ativos para uso em iscas no controle de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae).** 2005. 98f. Dissertação. (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2005.

BUENO, F.C. **Seleção de ingredientes ativos para o desenvolvimento de iscas tóxicas para o controle de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae).** 2013. 74f. Dissertação (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. **As formigas domésticas.** In: MARICONI, F.A.M. (Ed.). Insetos e outros invasores de residência. Piracicaba: FEALQ, p. 135-180, 1999.

BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A.; MATENHAUER, A. M. C. **Effect of sesame (*Sesamum indicum* L) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae).** Journal of Applied Entomology, v. 119, n. 1-5, p. 341-343, 1994.

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

CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro, 2002.

CAMARGO, R. S.; FORTI L. C.; FUJIHARA R. T.; ROCES F. **Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase**. *Insectes Sociaux*. 58:17-22, 2011.

CAMERON, R. S.; RIGGS, C. **Distribution, impact and control of the Texas leafcutting ant-1983 survey results**. Texas Forest Service Publication. 139p. 1985.

CARLOS, A.A. **Influência da Polpa Cítrica, do Óleo e de Fungos Filamentosos na Atratividade de Iscas Tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)**. 2008. 82f. Tese (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

CASTELLANI, M. A.; FORTI, L. C.; FENILLE, R. C.; MOREIRA, A.A.; ANDRADE, A. P. P.; NOVCAES, Q. S. **Isolation and growth of the symbiotic fungus of *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae)**. *Sociobiology*, Chico, v. 50, n. 3, p. 959-972, 2007.

CHERRETT, J. M. **The economic importance and control of leaf-cutting ants**. In: VINSON, S. B. *Economic impact and control of social insects*. New York: Praeger Publishers, p. 165-192, 1986.

CRUZ, J. M. da; NOGUEIRA, S. B.; PEREIRA, A. R.; NEUWES, B. O. **Adaptação de uma motocicleta para termonebulização no controle de formigas saúvas (*Atta* spp.) em áreas reflorestadas de cerrado**. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 8, n. 2, p. 104-111, 1984.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. **Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites**. *Nature*, London, v. 398, p.701-704, 1999a.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. **The agricultural pathology of ant fungus gardens.** Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999b.

CURRIE, C. R. **A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis.** Annual Review of Microbiology, v.55, p.357-380, 2001a.

CURRIE, C. R. **Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism.** Oecologia, v.128, p.99-106, 2001b.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. **Métodos atuais de controle e perspectivas.** In: DELLA LUCIA, T. M. C. As formigas-cortadeiras. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p. 163-176, 1993.

FERNANDES, J.B.; DAVID V.; FACCHINI P.H.; SILVA, M.F. das G.F.; FILHO, E.R.; VIERIA, P.C.; GALHIANE, M.S.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.; VICTOR, S.R.; SANTOS, A.M.R. **Extração de óleos de sementes de citrus e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte.** Quim. Nova, Vol. 25, n.6B, p.1091-1095, 2002.

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas-cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997.

FORTI, L. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; YASSU, W. K.; BENTO, J. M.; PINHÃO, M. A. – **Metodologias para experimentos com iscas granuladas para formigas-cortadeiras** – In: DELLA LUCIA, T. M. C – As formigas-cortadeiras – Folha de Viçosa, cap.13, Viçosa, p. 191-211, 1993

FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO D. R. **Controle de formigas-cortadeiras com isca granulada.** Anais do Simpósio sobre Formigas-cortadeiras dos Países do Mercosul, p.113-132, 1998.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p, 2002.

FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; RAMOS, V. M.; ANDRADE, A. P. P.; LOPES, J. F. S.; CAMARGO, R. S.; MOREIRA, A. A.; BOARETTO, M. A. C. **Eficiencia de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como sebos en el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera:Formicidae)**. Pasturas Tropicales, p. 28-35, 2003.

FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. **Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae)**. Environmental Entomology, College Park, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011.

FRAC. FRAC Cod list. 2013. **Fungicide sorted by mode of action**.2013.10p.

FREITAS, T.G. **Toxidade de extratos de *Rauia* sp. (RUTACEAE) para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA:FORMICIDAE)**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Área de Concentração: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 61f, 2010.

GODOY, M. de F. P. **Atividade de extratos vegetais e seus derivados sobre o crescimento do fungo simbiote de *Atta sexdens* L. e outros microrganismos**. 2003. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 101f, 2003.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; MAROTI, P. S.; PAGNOCCA, F. C.; DA SILVA O. A. **Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae)**. Journal of Applied Entomology, Goettingen, v. 124, p. 249-252, 2000.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. The Belknap Press. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, 732p. 1990.

JUSTI JUNIOR, J.; IMENES, S. de L.; BERGMANN, E. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. de C.; ZORZENON, F. J. **Formigas-cortadeiras**. São Paulo, Instituto Biológico, 1996, 31p. (Boletim Técnico n. 4).

KENNARD, C. P. **Control of leaf-cutting ants (*Atta spp.*) by fogging**. Experimental Agriculture, v. 1, n. 3, p. 237-240, 1965.

KERMARREC, A.; DECHARME, M.; FEBVAY, G. **Leaf cutting ant symbiotic fungi: a synthesis of recent research**. In: DELLA LUCIA, T. M. C. As Formigas-cortadeiras. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993.

LOFGREN, C. S.; STRINGER C. E.; BARTLETT F. J. **Imported fire ant toxic bait studies: GC-1283, a promising toxicant**. J. Econ. Entomol. 55(3):405-407. 1962

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. **Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae)**. Revista Àrvore, Viçosa, v.29, n.4, p. 553-561, 2005.

MARICONI, F.A.M. **Insetos e outros invasores de residências**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiróz, volume 6, FEALQ, Piracicaba. 460p.1970.

MARIN, N. de O. **Alterações nas dinâmicas de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1906 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) submetidas ao tratamento com iscas tóxicas**. 2014. 60f. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

MARINHO C. G. S.; DELLA LUCIA T. M.; PICANÇO M. C. **Fatores que dificultam o controle das formigas-cortadeiras**. Bahia Agricola. 7(2):18-21. 2006.

MIYASHIRA, C. H.; TANIGUSHI, D. G.; GUGLIOTTA, A. M.; SANTOS, D. Y. A. C. **Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* Forel in two culture media.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 41, p. 506-511, 2010.

MOIA, I.C., **Natureza do antagonista entre fungos oportunistas e o fungo cultivado pelas formigas-cortadeiras.** Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

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

NAGAMOTO N. S.; FORTI L. C.; ANDRADE A. P. P.; BOARETTO M. A. C.; WILCKEN C. F. **Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae).** Sociobiology. 44(2): 413-431. 2004.

NOGUEIRA, S. B.; CALIL, A. C. P.; BARRIGOSI, J. A. F. **Formicidas termonebuláveis no combate às espécies de saúvas, *Atta sexdens rubropilosa*, *A. laevigata* e *A. bisphaerica* (Formicidae: Hymenoptera).** Revista Seiva, v.41, n.89, p. 23-27, 1981.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. **Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus.** Physiological Entomology, London, v. 24, p. 127-133, 1999.

OLIVEIRA, J. C., **Iscas granuladas com atraente alternativo para *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias de saúveiros criados em laboratório.** 2001. 37 f. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas) Faculdade de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2001.

OLIVEIRA M. A.; ARAÚJO M. S.; MARINHO C. G. S.; RIBEIRO M. M. R. R.; DELLA LUCIA T. M. C. **Manejo de Formigas-cortadeiras.** Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo. 2011.

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

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

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, Lawrence, v. 96, p. 955-959, 2004.

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

SANTOS, M. P. A., **Avaliação do formicida citromax à base de fipronil no combate às saúvas (*Atta sexdens*).** Revista Controle Biológico On-line, v. 02, Jan 2010.

SANTOS-OLIVEIRA, M. F. S. **Controle de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais.** 2006.119f. Tese (Doutorado em Zoologia – Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI JR.; M. PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. **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, p. 4820-4822, 1998.

SOLOMON S. E.; BACCI Jr. M.; MARTINS Jr. J.; VINHA G. G.; MUELLER U. G. **Paleodistributions and Comparative Molecular Phylogeography of Leafcutter Ants (*Atta* spp.) Provide New Insight into the Origins of Amazonian Diversity.** Plos One. 3(7).2008.

SOUZA, M.D.; FILHO, O.P.; CALDEIRA, S.F.; PELISSARI, A.L.; DORVAL, A. **Análise de agrupamento e regressão não-linear aplicados ao crescimento in vitro de *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Moller em meios de cultura acrescido com diferentes extratos vegetais.** Biotemas, 24 (4); 85-93, 2011.

SOUZA-SILVA, A.; ZANETTI, R. **Forrageamento por *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) e campo em mudas de eucalipto pulverizadas ou imersas em soluções de extrato pirolenhoso.** Revista Àrvore, Viçosa, v.31, n.4, p.753-759, 2007.

SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R.; REHNER S. A. **Reciprocal illumination: a comparison of agriculture of humans and in fungus-growing ants.** In: VEGA, F. (Ed.). Insect-Fungal association: Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, p. 149-190. 2005.

STRINGER C. E.; LOFGREN C. S.; BARTLEY F. J. **Imported fire ant toxic studies: evaluation of toxicants.** Journal of Economic Entomology. 57(6): 941-945. 1964.

TOFOLO, V. C. **Toxicidade de formicidas usados em pastagens sobre a formiga não-alvo *Ectatomma Brunneum* (Hymenoptera, Formicidae e Ectatomminae) e seus efeitos na dinâmica populacional em condições de laboratório.**2007, 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2007.

VILELA, E. F. **Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brasil.** In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management. Boulder and London: Westview Press, p. 399-408, 1986.

WARD, P. S.; S. G. BRADY, B. L.; FISHER; T. R. SCHULTZ. 2015. **The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae).** *Systematic Entomology*. 40:61-81. doi:10.1111/syen.12090. 2015.

ZAMBOLIM, L; VENÂNCIO, W.S.; OLIVEIRA, S.H.F. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas.** Viçosa. UFV, 168p. 2007.

ZANETTI R.; JAFFE K.; VILELA E. F.; ZANUCIO J. C.; LEITE H. G. **Efeito da densidade e do tamanho de saueiros sobre a produção de madeira em eucaliptais.** Anais. Soc. Entomol. Brasileira. 29: 105-117. 2000.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, A.; SOUZA SILVA, A.; GODOY, M. S. **Manejo integrado de formigas-cortadeiras.** Lavras: UFLA, 2002. 16 p.

ZANETTI, R., ZANUNCIO, C. J.; SILVA, A. S.; ABREU, L.G. **Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).** Revista *Árvore*, Viçosa, v.27, n.3, p. 407-410, 2003.

ZANETTI, R.; ZANUCIO, C. J.; FERREIRA VILELA, E.; GARCIA LEITE H.; JAFFE K.; CLARET O. A. **Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Eucalyptus plantations in Brazil.** *Sociobiology*. 42(2): 433-442. 2003b.

ZANUNCIO, C. J.; ZANUNCIO, T.V.; PEREIRA, J. M. M.; OLIVEIRA, H. N. **Controle de *Atta laevigata* (hymenoptera: formicidae) com a isca landrin-f, em área anteriormente coberta com eucalyptus.** Revista *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 573-576, 1999.