

**Avaliação dos efeitos tóxicos de extrato hexânico de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) (Formicidae, Attini)**

**Mariana Silva Brugger<sup>1</sup>, Michele Aparecida Campolina Fernandes<sup>1</sup>, Noelle Martins dos Reis Hallack<sup>1</sup> & Juliane Floriano Santos Lopes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Mirmecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF - Campus Universitário, Bairro Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil. e-mail: mbruggerbio@yahoo.com.br

**Abstract.** Evaluation of toxic effects of hexanic extracts of *Azadirachta indica* (A. Juss) in *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) (Hymenoptera, Formicidae). The present study has as aim to investigate *Azadirachta indica* use as potential natural agent for leaf-cutting ants' control, as well as to verify behavioral alterations of *Acromyrmex rugosus* workers exposed to azadiractina. We evaluate the transport of *A. indica* baits and so its attractiveness potential as attractive substrate. After, we evaluated mortality of workers that were exposed to hexanic extracts of *A. indica*. *A. indica* baits were more attractive for *Acromyrmex rugosus* workers comparing with citric pulp baits, substrate commonly used in commercial toxic baits, however the high mortality verified earlier than desired exclude *A. indica* use for leaf-cutting ants control.

**Key words:** Leaf-cutting ants, azadiractina, behavior and control.

**Resumo:** O presente estudo teve por finalidade investigar o uso da planta *Azadirachta indica* como potencial agente natural no controle de formigas cortadeiras bem como verificar alterações comportamentais de operárias de *Acromyrmex rugosus* expostas ao i.a. azadiractina. Para tanto foi avaliado o carregamento de iscas de *A. indica* e a potencial atratividade destas para o forrageamento; posteriormente foi feita a avaliação da mortalidade de operárias às quais foram oferecidos extratos hexânicos de *A. indica*. As iscas de *A. indica* mostraram-se mais atrativas para as operárias de *Acromyrmex rugosus* em relação a polpa cítrica já comercialmente utilizada porém a alta mortalidade das operárias em um curto espaço de tempo descaracteriza a *A. indica* para utilização como formicida.

**Palavras-chave:** Formigas cortadeiras, azadiractina, comportamento e controle.

## INTRODUÇÃO

Consideradas pragas em áreas de cultivo, as formigas da espécie *Acromyrmex rugosus* F. Smith, 1858, utilizam pequenas partes de vegetais frescos como substrato para o desenvolvimento do seu fungo simbiote (DELLA LUCIA, 1993).

Atualmente, busca-se o controle dessas formigas através de inseticidas econômica e biologicamente viáveis. Nesse contexto plantas resistentes ao ataque de insetos através da produção de compostos tóxicos ou capazes de romper o ciclo de vida destes organismos (ARNASON *et al.*, 1989) constituem uma

alternativa de sucesso que deve ser amplamente estudada.

A planta *Azadirachta indica* (Nim), já testada para o controle de larvas de mosquito *Anopheles* (ALIERO, 2003) e do *Oligonychus ilicis*, o ácaro-vermelho-do-café (MOURÃO *et al.*, 2004), apresentou resultados satisfatórios para a utilização em programas de controle em ambos os testes.

A azadiractina extraída do Nim é o i.a. do inseticida Natucid® (68% do i.a., 0,18% de enxofre elementar e veículo Q.S.P. para 100%), apontado como um produto natural, atóxico e sem efeitos nocivos ao ambiente para o controle de formigas cortadeiras e cupins. Segundo os

fabricantes do Natucid, o produto se transmite por contato a todas as operárias da colônia causando desidratação celular nos insetos. Nesse caso, o Nim atuaria nos hidrocarbonetos cuticulares (HCC) das operárias.

Os hidrocarbonetos cuticulares destacam-se como os compostos mais comuns e abundantes na cutícula e têm a função primária de proteger o inseto contra a dessecação (LOCKEY, 1988) também atuando no processo de reconhecimento e discriminação entre formigas de uma mesma colônia ou de colônias diferentes (BONAVITA-CONGOURDAN *et al.*, 1993). Fatores genéticos participam da formação dos HCC em cada indivíduo, e a troca destas substâncias entre as operárias implica na manutenção do odor da colônia, o odor Gestalt (BOULAY *et al.*, 2000).

O uso de técnicas que visam à interrupção nos meios de reconhecimento entre indivíduos de uma colônia constitui uma opção viável onde a utilização de substâncias que possam desestruturar estes meios de comunicação e organização ocasionaria a falência da colônia. A incorporação destas substâncias naturais sob a formulação de iscas tóxicas é uma possibilidade plausível que pode ser utilizada para controle das formigas. Assim, o presente estudo tem por finalidade investigar o uso da planta *Azadirachta indica* como potencial desarticuladora dos sistemas de reconhecimento de uma colônia a partir do i.a. azadiractina estabelecendo sua capacidade enquanto agente natural no controle de formigas cortadeiras.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As colônias de *Acromyrmex rugosus* foram coletadas na natureza e mantidas em sistema fechado, um recipiente composto por três compartimentos interligados por tubos plásticos transparentes, correspondendo: arena de forrageio, câmara de fungo e material descartado (lixo). A temperatura e umidade foram mantidas constantes em laboratório a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  e  $75\% \pm 5$  U.R., respectivamente.

### Experimento 1: Comparação da atratividade de iscas de *Azadirachta indica* e Polpa Cítrica

A atratividade da *Azadirachta indica* foi testada em comparação com a polpa cítrica, esta já utilizada na formulação de iscas tóxicas para formigas. Para tanto foram preparadas iscas atrativas com canudos plásticos cortados no tamanho de 2mm. Os canudos foram embebidos em suco de laranja e açúcar na proporção 1:1 e empanados em pó de folhas, galhos e sementes de Nim moído (Tratamento Nim) ou com pó de polpa cítrica (Tratamento Polpa). Após secagem completa dos canudos, estes foram dispostos em uma arena 20x15cm conectada a câmara de fungo da colônia de *Acromyrmex rugosus*.

Na arena, as iscas foram distribuídas em duas fileiras alternadas do Tratamento Nim e Tratamento Polpa, sendo 10 iscas de cada um deles. Foram coletados dados relativos ao tempo de chegada da primeira operária na arena e qual foi o tipo de tratamento a ser primeiramente tocado com a antena.

O experimento era finalizado quando todas as iscas de um dos tratamentos eram carregadas. Foram realizados experimentos com três colônias de *A. rugosus* (Arr 03, Arr 06 e Arr 29) sendo feitas dez repetições com cada colônia. Os resultados obtidos foram submetidos a ANOVA dois componentes, sendo as iscas consideradas como tratamento e as colônias como blocos ( $p < 0,05$ ).

### Experimento 2: comportamento e Mortalidade de operárias de *A. rugosus* submetidas ao extrato hexânico de *A. indica* em diferentes concentrações

Utilizaram-se duas colônias de *A. rugosus* das quais foram isolados 30 grupos de 20 operárias cada, 24 horas antes dos experimentos começarem. A estes grupos foram oferecidos os tratamentos: 1-Nim 0,1%; 2- Nim 1%, 3- Nim 10%, 4- Controle positivo (polpa cítrica), 5- Controle negativo (sulfluramida), 6-Nim (pó).

Nos tratamentos com Nim foram utilizadas pastas formadas com extrato hexânico de Nim nas respectivas concentrações, glicose P.A. (10%), pó de polpa cítrica e óleo de soja (10%).

O tratamento sulfluramida também foi oferecido sob a forma pastosa, sendo a sulfluramida (0,3%) dissolvida em óleo de soja (10%) e misturada ao pó de polpa de citros e glicose P.A.(10%).

O controle positivo foi obtido apenas com a mistura do pó de polpa de citros, óleo de soja e glicose P.A. (10%), sem adição de ingrediente ativo à pasta.

O tratamento seis foi composto a partir de Nim em pó, óleo de soja (10%) e glicose P.A. (10%).

Cada tratamento constou de cinco repetições. As aplicações foram feitas com 5g de pasta por repetição e retiradas dos potes após 48 horas. As observações tiveram a duração de 5 minutos e foram realizadas nos períodos imediatamente (A), 30 minutos (B) e 24 horas (C) após o tratamento, sendo calculadas as freqüências relativas referentes a cada comportamento executado pelas operárias e o número de mortes.

Os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1: Comparação da atratividade de iscas de *Azadirachta indica* e Polpa Cítrica

Os dados relativos ao tempo de chegada da primeira operária à arena de forrageio (escoteira) estão apresentados na tabela 1. O direcionamento da escoteira para a arena de forrageamento depende de vários fatores, destacando-se, tamanho da colônia, motivação da operária, experiência da operária, atratividade do substrato oferecido.

Quanto ao primeiro substrato antenado, registrou-se que as iscas elaboradas com polpa cítrica foram primeiramente antenadas em 65,4% das repetições sendo, portanto, o Nim primeiramente antenado em 34,6% das repetições.

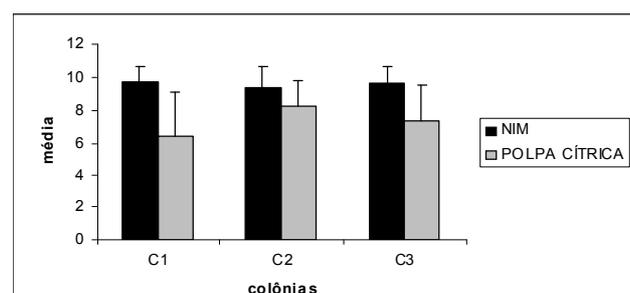
**Tabela 1.** Tempo médio, máximo e mínimo (segundos) de chegada da primeira operária – escoteira - de *A. rugosus* na arena de forrageamento em três diferentes colônias (Arr03, Arr06, Arr29).

Colônias	Tempo médio (s)	Tempo máximo (s)	Tempo mínimo (s)
Arr 03	38	250	1
Arr 06	105	518	1
Arr 29	29	228	1

A ação atrativa da polpa cítrica é conhecidamente confirmada, sendo usada atualmente como substrato atrativo para a formulação de iscas tóxicas peletizadas de todas as marcas comercializadas no Brasil. Entretanto, comparando-se o carregamento das iscas de ambos os tratamentos, registrou que não houve efeito da colônia e que o tratamento Nim foi significativamente mais carregado pelas operárias de *A. rugosus* (Fig.1) ( $F_{\text{tratamentos}} = 5,96$ ,  $p = 0,0004$ ;  $F_{\text{blocos}} = 0,45$ ,  $p = 0,8965$ ).

Características físicas e químicas do substrato vegetal (STRADLING, 1978; SWAIN, 1979; BOWERS & PORTER, 1981) e as necessidades nutricionais individuais, da colônia e do fungo simbiote (LITTLEDYKE & CHERRETT, 1978; MATTSON, 1980; BOWERS & PORTER, 1981) irão influenciar na seleção deste pela formiga escoteira e considerando-se que esta é capaz de transmitir informações a respeito da qualidade da fonte alimentar, as operárias recrutadas podem estar condicionadas ao odor do fragmento carregado pela escoteira e utilizá-lo como um sinal memorizado que influencia na decisão de qual substrato deve ser carregado (ROGES, 1990, 1994; LOPES *et al.*, 2004).

Por tratar-se de substratos que foram oferecidos pela primeira vez as colônias, qualquer efeito de condicionamento ou habituação pode ser descartado. Também as características físicas dos tratamentos



**Figura 4.** Número médio de iscas carregadas do Tratamento Nim e Tratamento Polpa por operárias de *A. rugosus*, em três colônias de laboratório.

foram padronizadas e as colônias receberam o mesmo tipo de cuidado diário (folhas oferecidas para o forrageio e manutenção de temperatura e umidade), o que permite sugerir que a seleção da escoteira foi baseada nas características químicas do substrato ou em suas necessidades individuais.

## Experimento 2. Comportamento e mortalidade de operárias de *A. rugosus* submetidas ao extrato hexânico de *A. indica* em diferentes concentrações

Após a aplicação das pastas dos diferentes tratamentos foram registrados os seguintes comportamentos para as operárias de *A. rugosus*: **a) Antenar:** a operária toca o tratamento com as antenas; **b) Antenar e afastar:** consiste na aproximação da formiga aos tratamentos e logo após a antenação esta se afasta rapidamente, locomovendo-se no sentido ântero-posterior; **c) Grooming:** após tocar o tratamento com as antenas, a operária se limpa passando as pernas anteriores pelas antenas no sentido próximo-distal e logo após a formiga as leva ao aparato bucal; **d) Luta:** operárias entram em confronto direto na arena, mordendo umas as outras; **e) Alimentando:** a formiga lambe o tratamento; **f) Paradas:** operária permanece imóvel.

Na fase A, para todos os tratamentos, o ato de antenar e se afastar foi significativamente mais freqüente ( $p < 0,05$ ), embora este ato não se diferencie estatisticamente de antenar para os tratamentos 1 e 6. Já para os tratamentos 4 e 5, os comportamentos antenar e se afastar, antenar e grooming não se diferenciaram significativamente. Cabe ressaltar que a freqüência do comportamento de luta não diferiu significativamente dos comportamentos de antenar e grooming, para o tratamento 5 (Fig.2). A ausência de luta nos tratamentos contendo Nim sugere que não houve influência deste no sistema de reconhecimento das operárias. MARINHO *et al.* (2005) observaram alteração comportamental de operárias de *Atta sexdens*

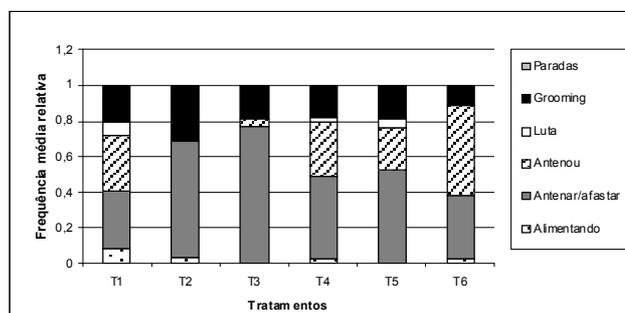


Figura 2. Frequência média relativa dos comportamentos exibidos por operárias médias de *Acromyrmex* imediatamente após aplicação dos tratamentos.

*rubropilosa* expostas a papéis de filtro impregnados com diferentes concentrações de beta-eudesmol e sugerem que este composto foi o responsável pelo comportamento agressivo entre as operárias que provavelmente interferiu no reconhecimento entre companheiras de ninho.

As observações registradas para a fase A indicam que as operárias expostas a um novo substrato exibem um comportamento exploratório com provável função de reconhecimento e o rápido afastamento das mesmas pode ser um indicativo de repelência ou em função do ineditismo frente a novos substratos. Operárias de *Atta cephalotes* expostas a extratos de cariofileno, de *Hymeneia courbaril* exibiram o mesmo comportamento de afastamento frente a um novo substrato (HUBBELL *et al.*, 1983).

Para a fase B, nos tratamentos 1, 5 e 6, somente foram executados o comportamentos de grooming e permanecer imóvel sendo que ambos não diferiram significativamente entre si. Nos tratamentos 2 e 3, os comportamentos exibidos foram permanecer imóvel, grooming e lamber a pasta não ocorrendo diferença significativa entre os três. Para o tratamento 3 o ato de antenar e se afastar também foi registrado. No tratamento 4, os comportamentos exibidos foram grooming, luta e permanecer imóvel sendo este último significativamente mais freqüente em relação aos demais (Fig.3).

A alta freqüência de exibição tanto do grooming quanto do comportamento de permanecer imóvel pode ser justificada nesta fase de observação (30 minutos após a colocação da pasta), em função das operárias já terem percebido os odores anteriormente, na fase A (5 minutos após). Ressalta-se que para os tratamentos comercialmente utilizados (Trat. 4 e 5), estes atos comportamentais já haviam sido observados. A alta freqüência do ato de permanecer imóvel permite sugerir que os tratamentos não tinham efeito repelente.

Para a fase C, nos tratamentos 1 e 3 foram executados apenas os comportamentos de grooming e permanecer imóvel não havendo diferença significativa entre ambos. No tratamento 2, os mesmos comportamentos foram executados sendo permanecer imóvel

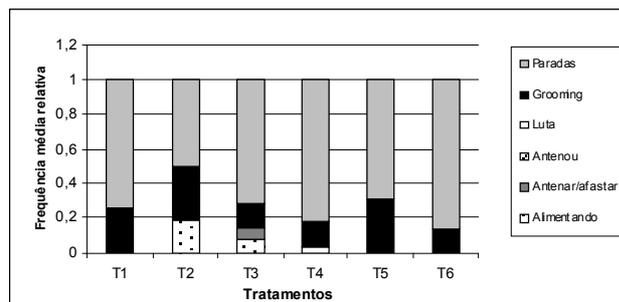


Figura 3. Frequência relativa dos comportamentos exibidos por operárias médias de *Acromyrmex rugosus* 30min após aplicação dos tratamentos.

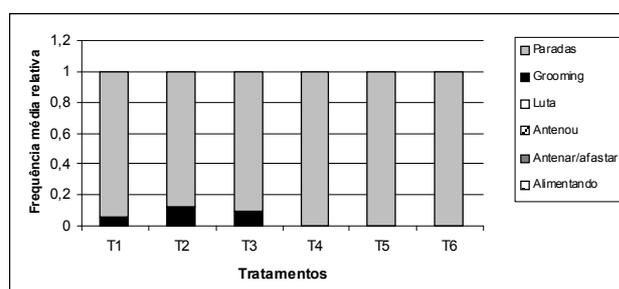


Figura 4. Frequência relativa dos comportamentos exibidos por operárias médias de *Acromyrmex* 24h após aplicação dos tratamentos.

significativamente mais freqüente. Nos tratamentos 4, 5 e 6 o único comportamento exibido foi permanecer imóvel (Fig.4).

Nota-se haver um aumento no comportamento de permanecer imóvel com o decorrer do tempo. Este comportamento além de freqüente em *Acromyrmex* é uma estratégia de defesa das operárias típica da espécie (L.C. Forti, comunicação pessoal) além de também estar relacionado com a não ocorrência de substâncias repelentes e/ou atrativas.

Os dados de mortalidade das operárias nas diferentes fases estão apresentados na figura 5. Ressalta-se que na fase C o número médio de mortes foi significativamente maior para os tratamentos 1, 2 e 3. A alta mortalidade registrada nas primeiras 24 horas nos tratamentos com extrato hexânico de Nim não corresponde com a ação lenta desejada para formicidas. A ação retardada de ingredientes ativos para formulação de formicidas é uma característica essencial, haja vista que as colônias de formigas cortadeiras são muito populosas e o controle de um ninho depende da contaminação de todos os indivíduos.

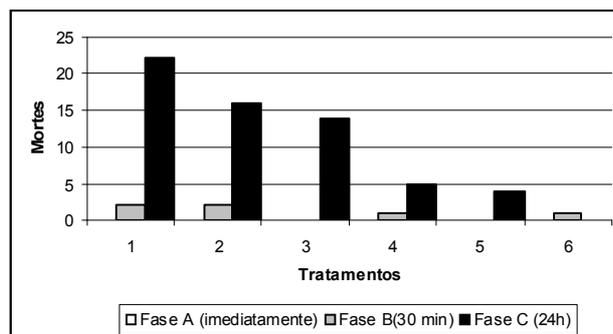


Figura 5. Número de mortes de operárias médias de *Acromyrmex* imediatamente, 30 minutos e 24 horas após aplicação dos tratamentos.

Caso as formigas “percebam” que o substrato utilizado não foi adequado elas deixam de carregá-lo, podendo inclusive retirar partes do fungo simbiote contaminado com esse substrato, isolando-os nas câmaras de lixo (L.C. Forti, comunicação pessoal).

Aliando-se os resultados obtidos nos experimentos de atratividade (Exp.1) e mortalidade (Exp.2), sugere-se que o Nim não possui as características necessárias para utilização como substrato atrativo nem como ingrediente ativo para o controle de *Acromyrmex rugosus*, pois embora tenha sido mais atrativo que a polpa cítrica e tenha causado alta mortalidade, esta ocorreu muito rapidamente, o que contraria as predições para um formicida. Os resultados obtidos confirmam a análise química do produto Natucid, que continha informações como sendo um produto 100% natural, porém havia fipronil em sua formulação. Portanto, a eficiência verificada para o Natucid deve-se ao fipronil e não a azadiractina.

Quanto ao efeito tóxico do extrato hexânico de *A. indica* este é confirmado através dos resultados obtidos embora este pareça não agir nos sistemas de reconhecimento haja vista a ausência de comportamentos agressivos das operárias expostas ao extrato nas diferentes concentrações.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Daniel Sales Pimenta pelo auxílio na obtenção do extrato; Ao Dr. Belmiro Neves pela doação do pó de nim; Ao CNPq e Pró-Reitoria de Pesquisa da UFJF pelas bolsas de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIERO, B.L. 2003. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of *Anopheles* mosquito. **African Journal of Biotechnology**, **2** (9): 325-327.
- ARNASON, J.T.; PHILOGÉNE, B.J.R.; MORAND, P. 1989. **Insecticides of plant origin**. Washington: The American Chemical Society, 213p.
- BONAVITA-COUGOURDAN, A.; CLEMENT, J. L.; LANGE, C. 1993. Functional subcaste discrimination (foragers and brood-tenders) in the ant *Camponotus vagus* Scop: polymorphism of cuticular hydrocarbon patterns. **Journal of Chemical Ecology**, **9** (7):1461-1477.
- BOULAY, R. 2000. *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. **Animal Behavior**, **59**: 1127-1133.
- BOWERS, M.A. & PORTER, S.D. 1981. Effect of foraging distance on water content of substrates harvested by *Atta colombica* (Guerin). **Ecology**, **62**: 273-275.
- DELLA LUCIA, T.M.C., OLIVEIRA, M.A. 1993. Forrageamento. In: T.M.C. Della Lucia (ed.), **As Formigas Cortadeiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 262p.
- HUBBELL, S.P.; WIEMER, D.F.; ADEJARE, A. 1983. An antifungal terpenoid defends a Neotropical tree (Hymenaeae) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). **Oecologia**, **60**: 321-327.
- LITLEDYKE, M. & CHERRETT, J. M. 1978. Olfactory responses of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. **Bulletin of Entomological Research**, **68**: 273-282.
- LOPES, J.F.S.; FORTI, L.C.; CAMARGO, R.S. 2004. The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in three *Acromyrmex* species (Formicidae: Attini). **Behavioural Processes**, **67**: 471-476.
- MATTSON, W.J. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. **Annual Review of Ecological Systematics**, **11**: 119-161.
- MOURÃO, S.A., *et al.* 2004. Toxicidade de extratos de *Nim* (*Azadirachta indica*) ao ácaro-vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, **39** (8): 827-830.
- ROCES, F. 1990. Olfactory conditioning in a leaf cutting ant. **Oecologia**, **83**: 261-262.
- ROCES, F. 1994. Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. **Insectes Sociaux**, **41**: 235-239.
- STRADLING, D.L. 1978. The influence of size on foraging in the ant *Atta cephalotes* and the effect of some plant defence mechanisms. **Journal of Animal Ecology**, **47**: 173-178.
- SWAIN, T. 1979. Tannins and lignins. In: ROSENTHAL, G.A. & JANZEN, D.P (ed.). **Herbivore: their interactions with secondary plant metabolites**. Academic Press, New York.

Recebido: 09/02/2007

Revisado: 12/12/2007

Aceito: 25/04/2008