

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

FLÁVIA MARIA GUSTANI

**SÍNTESE, ATRATIVIDADE E EFICÁCIA DE ENCAPSULADOS
SOBRE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Araras, 2019

FLÁVIA MARIA GUSTANI

**SÍNTESE, ATRATIVIDADE E EFICÁCIA DE ENCAPSULADOS
SOBRE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara
Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz

Araras, 2019

Gustani, Flávia Maria

SÍNTESE, ATRATIVIDADE E EFICÁCIA DE ENCAPSULADOS
SOBRE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) / Flávia Maria
Gustani. -- 2019.
76 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

Orientador: Ricardo Toshio Fujihara

Banca examinadora: Ricardo Toshio Fujihara, Adriano Lopes de Souza,
Raphael Vacchi Travaglini

Bibliografia

1. Biopolímeros. 2. Formigas-cortadeiras. 3. Quitosana. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Flávia Maria Gustani, realizada em 06/06/2019:

Ricardo Toshio Fujihara

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara
UFSCar

Adriano Lopes de Souza

Prof. Dr. Adriano Lopes de Souza
UFSCar

Raphael Vacchi Travaglini

Prof. Dr. Raphael Vacchi Travaglini
Travaglini

AGRADECIMENTOS

O Presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) Código de Fianciamento 001.

Gostaria de agradecer a Deus por todas as bênçãos recebidas ao longo da vida.

À minha família por todo amor, apoio emocional e financeiro no decorrer de todos esses anos. Por tornarem o sonho do ensino superior realidade, em especial meus pais Lúcia e Carlos, minha vó Terezinha e irmã Emanuele.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara, pela confiança, orientação, amizade, com toda certeza levarei seus ensinamentos para a vida.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz por todo o auxílio e aprendizagem em química que me ofertou durante o desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em especial o Centro de Ciências Agrárias (CCA) e ao Programa de Pós- Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) por poder realizar o trabalho.

Ao Laboratório de Sensores, Nanomedicina e Materiais Nanoestruturados (LS-Nano) por ceder o espaço e material de consumo na produção dos encapsulados.

À Naiara Zambianco por toda ajuda nas caracterizações químicas dos encapsulados, bem como na interpretação dos resultados.

À Profa. Dra. Josiane Rodrigues por todo suporte estatístico no desenvolvimento do trabalho.

Ao Grupo de Estudos e Pesquisa em Entomologia Geral (GEPEG) por todo aprendizado proporcionado, formação em minicursos, e por ceder o laboratório para a realização dos experimento abordados nessa dissertação.

Ao aluno Erick Sekiama Rocha por toda ajuda prestada na execução do capítulo III.

À empresa BASF por doar as colônias de *Atta sexdens* para o desenvolvimento da pesquisa.

À empresa Syngenta, em especial a Adriana Cristina Nardon, por doar o material de consumo e ter contribuído para a funcionalidade do laboratório.

À empresa Dominus Química por doar o ingrediente ativo para a fabricação dos encapsulados.

À empresa Sucorrico pela doação de polpa cítrica processada, ingrediente atrativo que compôs os encapsulados.

Ao Laboratório de Ensino de Química (LEQ), em especial aos técnicos Leonardo Jundi Hayasida e Yves Aikawa, por todo o auxílio nas técnicas com o espectrômetro de infravermelho.

A todos que contribuíram para a minha formação, em especial meus orientadores, Profa. Dra. Cacilda Marcia Duarte Rios Faria, Profa. Dra. Cristiane Nardi e Dr. Marcos Rafael Gusmão.

Às meninas da República Girls in the House, por todas as conversas, e boa convivência.

À minha turma de mestrado que esteve ao meu lado sempre me apoiando.

Aos meus amigos Christian Lopes, Dioni Stroparo, Marcos Moraes, Caroline Goulart, Juliana Gilbert, Guillermo Grandini, Caio Noboa, Cristiane Pereira e Isabela Andreotti.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae, Attini) são pragas desfolhadoras de grande importância agrícola. O método de controle mais efetivo é o químico, com o uso de iscas granuladas contendo sulfluramida. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um encapsulado à base de quitosana e tapioca, compatível com o ingrediente atrativo (polpa cítrica) e com o ingrediente ativo (sulfluramida). Para a síntese dos encapsulados, utilizou-se 30 mL da solução de quitosana, 6 mL da solução de tapioca, 6 mL da solução de acetona com sulfluramida e, por último, 3 g de polpa cítrica, adicionados gradualmente sob agitação constante. A solução final foi gotejada em NaOH (1 mol) e, após o processo de precipitação, os encapsulados foram submetidos à secagem em placa de Petri aberta a 24°C por 2 dias. A fim de confirmar a presença da sulfluramida no encapsulado foram feitas análises em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração Por Raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). De acordo com as caracterizações realizadas por FTIR, DRX e MEV, foi detectada a presença da sulfluramida nos encapsulados sintetizados. Para avaliar a atratividade e a incorporação, foram observados os atos comportamentais relativos aos discos foliares e encapsulados: segurá-los sobre o fungo; lambar sua superfície; picotá-los em fragmentos menores; preguiamento ou preensão de suas bordas; deposição de fluido fecal; incorporação no jardim de fungo e deposição de hifas sobre os fragmentos recém incorporados. Houve rejeição e redução no carregamento dos encapsulados à base de quitosana e tapioca em comparação aos discos foliares. Os atos comportamentais mais frequentes no processamento do encapsulado foram: lambar (21,53%), segurar o encapsulado (21,41%) e transportar o encapsulado (18,57%). A casta que mais atuou no processamento de encapsulados foram as jardineiras (50,59%). Para avaliar a mortalidade acumulada de operárias de *Atta sexdens* foram ofertados encapsulados sem ingrediente ativo (ESA), encapsulados contendo sulfluramida a 2% (m/v) (E2%) e isca granulada comercial Mirex[®] (IGC). Para tanto, foram feitas avaliações aos 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21 dias após aplicação dos tratamentos e a mortalidade foi contabilizada por dia. As médias de mortalidade foram corrigidas pela fórmula de Abbott. Foram avaliados os sintomas de intoxicação que correspondem a: t= tremores; l= movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas; p= pernas traseiras paralisadas; i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gáster com movimentos normais; g= paralisia geral; Para a análise dos dados foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a

nível de significância de 5% seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Foi observado que em ESA os sintomas se acentuaram até o 11º dia, onde os índices de mortalidade registrados foram de 64%. Já o tratamento E2% apresentou sintomas desde o primeiro dia, e no 14º dia todas as operárias estavam mortas. O tratamento IGC, assim como em E2%, apresentou sintomas acentuados desde do primeiro dia. No nono dia de avaliação já apresentava 100% de operárias mortas. Comparando os tratamentos entre si, a mortalidade de E2% e IGC foram significativamente maiores do que em ESA. Os encapsulados comprovadamente permitiram a intoxicação de operárias e causaram mortalidade na mesma proporção que as iscas granuladas comerciais.

Palavras-chave: biopolímeros, formigas-cortadeiras, quitosana, tapioca, sulfluramida.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini) are defoliation pests of great agronomic importance. The most effective control method is chemical, by using granulated baits containing sulfluramide as standard active ingredient. Therefore, the objective of this work was to develop an encapsulated based on chitosan and tapioca, compatible with the attractive ingredient (citrus pulp) and with the active ingredient (sulfluramide). For the synthesis of the encapsulates 30 mL of the chitosan solution, 6 mL of tapioca solution, 6 mL of acetone solution with sulfluramide and finally 3 g of citrus pulp were gradually added under constant stirring. The final solution was dripped in NaOH (1 mol) and after the precipitation process the encapsulates were subjected to Petri dish drying at 24°C for 2 days. In order to confirm the presence of sulfluramide in the encapsulated, Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM) were performed. According to the characterizations made by FTIR, XRD and SEM, the presence of sulfluramide was confirmed in the synthesized encapsulated. To evaluate the attractiveness and the incorporation, the behavioral acts were observed regarding the foliar and encapsulated disks: to hold them on the fungus; lick its surface; puncture them into smaller fragments; pleating or gripping its edges; deposition of fecal fluid; incorporation in the fungus garden and deposition of hyphae on the newly incorporated fragments. There was rejection in the loading and the incorporation of encapsulated based on chitosan and tapioca in comparison to leaf discs. The most frequent behavioral acts in the processing of the encapsulated were: licking (21.53%), holding the encapsulated (21.41%) and loading the encapsulated (18.57%). The caste that most acted in the processing of encapsulated were the gardeners (50.59%). To evaluate the accumulated mortality of *Atta sexdens* workers were supply encapsulated without sulfluramide (ESA); encapsulated with 2% (m/v) sulfluramide (E2%); commercial bait Mirex™ (IGC). For that, evaluations were done at 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 and 21 days after treatment application, and the mortality was accounted per day. Mortality averages were corrected for the Abbott formula. The symptoms of intoxication corresponded to: t = tremors; l = slow movements; f = difficulty in moving legs; d = paralyzed front legs; p = paralyzed hind legs; i = all legs paralyzed, but antennas and gaster with normal movements; g = general paralysis. The non-parametric test Kruskal-Wallis was used for the analysis of the data at significance level ($p < 0.05$), followed by test Student-Newman-Keuls. It was observed that in ESA the symptoms increased until the eleventh day, where the registered mortality rates were 64%.

The E2% treatment presented symptoms from the first day and the 14th day all the workers were in dead. The treatment IGC, as in E2%, presented marked symptoms from the first day. On the ninth day of evaluation, it already had 100% of workers dead. Comparing the treatments between each other the mortality of E2% and IGC were significantly higher than in ESA. The encapsulated proved to have allowed the intoxication of workers causing mortality in the same proportion as the granulated baits.

Keywords: biopolymers; ants-cutters; chitosan; encapsulation; sulfloramida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da sulfluramida. Fonte: CAGNETTA et al. (2017)	4
Figura 2: Estrutura molecular da quitosana de baixo peso molecular. Fonte: SIGMA-ALDRICH (2019)	6
Figura 3: A) Estrutura molecular da amilose. B) Estrutura molecular da amilopectina. Fonte: ISMAIL et al. (2013)	7

CAPÍTULO I

Figura 1: Produção do encapsulado de quitosana e tapioca com a adição de sulfluramida dissolvida em acetona	17
Figura 2: A) Preparação da amostra para formação da pastilha de KBr. B) Retirada da pastilha de KBr. C) Alocação da pastilha de KBr no aparelho para leitura de infravermelho	18
Figura 3: Espectros de infravermelho dos encapsulados sem ingrediente ativo, com 2, 10 % de sulfluramida e sulfluramida pura	21
Figura 4: Difratoogramas de raio-X obtidos para tapioca (preto), quitosana (vermelho) e mistura de quitosana com tapioca (azul)	22
Figura 5: Difratoogramas de sulfluramida (azul), encapsulado 10% (vermelho) e encapsulado 2% (preto)	23
Figura 6: Difratoogramas de encapsulado 10% (vermelho) e encapsulado 2% (preto)	23
Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície de encapsulados compostos por quitosana e tapioca. A) resolução de 10 μm . B) resolução de 5 μm . C) resolução de 1 μm	24
Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície de encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 2% (m/v). A) resolução de 10 μm . B) resolução de 5 μm . C) resolução de 1 μm . D) resolução de 1 μm das demais lâminas	25
Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície de encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 10% (m/v). A) resolução de 10 μm . B) resolução de 5 μm . C) resolução de 1 μm	26

CAPÍTULO II

Figura 1: Caixa de vidro (câmara de fungo) conectada à câmara de lixo (à esquerda) e de forrageamento (à direita)	32
Figura 2: Síntese dos encapsulados e incorporação de polpa cítrica	33
Figura 3: Processo de fabricação de encapsulados à base de quitosana e tapioca: A) Gotejamento na solução de NaOH. B) Secagem a 24°C em placa de Petri. C) Encapsulados secos	34
Figura 4: Tempo de carregamento, em segundos, de discos foliares e encapsulados por operárias de <i>Atta sexdens</i> . Teste de Mann-Whitney a 5% de significância	36

Figura 5: Porcentagem de cada ato comportamental exercido por operárias de *Atta sexdens* na preparação e incorporação no jardim de fungo dos discos foliares. 1: Transportar o disco para a superfície do jardim de fungo; 2: Segurando o disco na superfície da cultura de fungos; 3: Lamber superfície e bordas do disco foliar; 4: Picotar o disco foliar em fragmentos menores; 5: Preguear as bordas; 6: Deposição de fluido fecal; 7: Incorporação no jardim de fungos; 8: Deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados 38

Figura 6: Porcentagem de cada ato comportamental exercido por operárias de *Atta sexdens* na preparação e incorporação no jardim de fungo dos encapsulados. 1: Transportar o encapsulado para a superfície do jardim de fungo; 2: Segurando o encapsulado; 3: Lambendo superfície; 4: Fragmentação do encapsulado; 5: Prensar o fragmento; 6: Depositar fluido fecal; 7: Incorporação no jardim de fungos; 8: Deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados). 41

Figura 7: Comportamentos comparados entre discos foliares e encapsulados. A: Transportar; B: Segurar o disco/encapsulado; C: Lamber a superfície; D: Fragmentar; E: Preguear/Prensar o fragmento; F: Depositar fluido fecal; G: Incorporar no jardim de fungos; H: Depositar hifas sobre os fragmentos incorporados 43

CAPÍTULO III

Figura 1: Subcolônias de *Atta sexdens* preparadas para os ensaios e acondicionadas em BOD54

Figura 2: Subcolônia contendo 3 cm³ de fungo, 20 operárias com largura de cápsula cefálica de 2,2 mm e 20 operárias mínimas55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: Porcentagem de indivíduos (por casta) que desempenharam comportamentos durante a preparação e incorporação de discos foliares 39

Tabela 2: Porcentagem de indivíduos (por casta) que desempenharam comportamentos durante a preparação e incorporação de encapsulados 42

CAPÍTULO III

Tabela 1: Mortalidade acumulada aos 21 dias de avaliação. Encapsulados sem ingrediente ativo. Sintomas de morbidez em operárias: t= tremores; l= movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas; p= pernas traseiras paralisadas; i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gáster com movimentos normais; g= paralisia geral. Porcentagem de mortalidade, corrigida pela fórmula de Abbott 56

Tabela 2 : Mortalidade acumulada aos 21 dias de avaliação . Tratamento E 2 % . Sintomas de operárias intoxicadas: t = tremores; l = movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas ; p = pernas traseiras paralisadas; i = todas as pernas paralisadas, mas antenas e gaster com movimentos normais; g= paralisia geral . Porcentagem de mortalidade , corrigida pela Fórmula de Abbott (1925)..... 57

Tabela 3: Mortalidade acumulada aos 21 dias de avaliação. Tratamento IGC. Sintomas de morbidez em operárias: t= tremores; l= movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas; p= pernas traseiras paralisadas; i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gaster com movimentos normais; g= paralisia geral. Porcentagem de mortalidade, corrigida pela Fórmula de Abbott (1925)... 58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.2 Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos Específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1. As formigas-cortadeiras	2
3.2. Danos e prejuízos provocados por formigas-cortadeiras	3
3.3. Manejo de formigas-cortadeiras	4
3.4. Encapsulamento e biopolímeros no controle de pragas agrícolas	5
3.5. Seleção de substratos pelas formigas-cortadeiras	8
4. REFERÊNCIAS.....	8

CAPÍTULO I

Síntese de encapsulados à base de quitosana e tapioca para o controle de formigas-cortadeiras

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Produção de encapsulados à base de quitosana e tapioca	16
2.2. Caracterização dos encapsulados contendo sulfluramida	17
2.2.1. Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	17
2.2.2. Difração de Raios-X (DRX).....	18
2.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	19
3.2. Difração de Raios-X (DRX)	21
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	24
3.3.1. Encapsulados compostos por quitosana e tapioca	24
3.3.2. Encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 2% (m/v)	25
3.3.3. Encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 10% (m/v)	25
4. CONCLUSÕES	26
5. REFERÊNCIAS.....	26

CAPÍTULO II

*Avaliação do atos comportamentais relacionados à atratividade e incorporação de encapsulados por operárias de *Atta sexdens**

RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	32

2.1. Criação das colônias de <i>Atta sexdens</i>	32
2.2. Incorporação de polpa cítrica diretamente no processo	33
2.3. Atratividade e incorporação em laboratório	34
2.4. Análises dos dados	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Tempo de carregamento	35
3.2. Processamento e incorporação dos discos foliares	37
3.2. Processamento e incorporação dos encapsulados	40
3.3. Comportamentos comparados: Disco <i>versus</i> Encapsulado	43
4. CONCLUSÕES	44
5. REFERÊNCIAS	44

CAPÍTULO III

Avaliação da mortalidade de operárias de Atta sexdens após a oferta de encapsulados contendo sulfuramida

RESUMO	48
ABSTRACT	50
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Criação das colônias de <i>Atta sexdens</i>	53
2.2. Preparação dos encapsulados controle e com ingrediente ativo	53
2.3. Aplicação dos tratamentos	53
2.4. Análise dos dados	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS	59
5. CONCLUSÕES GERAIS	61

1. INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras são popularmente conhecidas como saúvas (*Atta*) e quenquéns (*Acromyrmex*) e possuem o hábito de cortar folhas, flores e ramos tenros das plantas (BRITTO et al., 2016), para o cultivo do fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* (ESTRADA et al., 2014). O fungo é dieta exclusiva das larvas e importante constituinte na alimentação de operárias, que também ingerem os líquidos extraídos das folhas, durante a coleta e processamento do substrato (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1976; PAUL; ROCES, 2003).

Tal comportamento confere às formigas-cortadeiras o status de praga agrícola, pois atacam plantas cultivadas, pastagens e reflorestamentos, causando danos severos de desfolha, que podem chegar a 100% nos estádios iniciais das plantas (DELLA LUCIA, 2003; BRITTO et al., 2016). Os fatores que mais afetam o controle de formigas-cortadeiras são a complexa organização social, o acurado sistema de limpeza, ninhos bem estruturados, e o cultivo de fungo mutualístico (DELLA LUCIA et al., 2014).

O método mais efetivo para o seu controle é o químico por meio de iscas granuladas, e cujo principal ingrediente ativo é a sulfluramida (BRITTO et al., 2016). A sulfluramida é eficiente por causar mortalidade em baixas concentrações, não possuir odor, ter modo de ação lento e contaminar operárias por ingestão (NICKELE, 2008). Levando em consideração a viabilidade técnica, atualmente não existem substitutos para a sulfluramida no Brasil (UNEP, 2016), e neste sentido, foram iniciadas buscas por novos ingredientes ativos ou formas mais eficientes de se utilizar a sulfluramida.

Com o surgimento de novas tecnologias, uma das técnicas que tem mostrado bons resultados é o método do encapsulamento, no qual são produzidas esferas envolvidas por um biopolímero e a substância de interesse é liberada de forma lenta e gradativa. A técnica é extensivamente adotada na indústria de fertilizantes e fármacos (SILVA, 2016), e se mostra promissora para ser utilizada com pesticidas.

Alguns autores vêm estudando o encapsulamento de inseticidas, como por exemplo, Buteler et al. (2018), que avaliaram a atividade formicida da alumina nanoestruturada comparada à terra de diatomácea, em operárias de *Acromyrmex lobicornis* Emery (1887). O estudo inédito relatou que a toxicidade da alumina nanoestruturada foi mais eficaz no controle de *A. lobicornis* do que terra de diatomácea.

Tendo em vista os benefícios desta técnica, o presente trabalho buscou avaliar a compatibilidade de encapsulados à base de quitosana e tapioca (biopolímeros promissores

para encapsulamento) com o ingrediente ativo sulfluramida, e assim, demonstrar sua viabilidade de uso.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar encapsulados à base de quitosana e tapioca, avaliando a atratividade e mortalidade em operárias de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758).

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de síntese e caracterizar encapsulados à base de quitosana e tapioca;
- Avaliar a atratividade e a incorporação dos encapsulados no fungo mutualístico por operárias de *A. sexdens*;
- Avaliar a mortalidade de operárias de *A. sexdens* após a oferta de encapsulados contendo sulfluramida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. As formigas-cortadeiras

As formigas (Hymenoptera, Formicidae) são insetos sociais e encontram-se distribuídas em 17 subfamílias, 334 gêneros e 13.450 espécies (BOLTON, 2018). Sua origem data do Cretáceo Superior, há cerca de 110 a 130 milhões de anos (GRIMALDI et al., 1997). Apenas 5% de seus representantes, que compreendem as formigas-cortadeiras, são considerados pragas e interferem no processo produtivo agrícola (FOWLER et al., 1989). Essas surgiram entre 5 a 15 milhões de anos atrás, um período que coincide com a expansão das pastagens na América do Sul (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

As formigas-cortadeiras são conhecidas como saúvas (gênero *Atta*) e quenquéns (gênero *Acromyrmex*) (Myrmicinae, Attini) e vivem exclusivamente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina (BRITTO et al., 2016). Sua denominação popular é devido ao hábito de cortar folhas, flores e ramos tenros das plantas (URBAS, 2007), e utilizar como substrato para o cultivo do fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* (MUELLER et al., 2017), cujas hifas são alimento exclusivo das larvas, e importante constituinte na alimentação das operárias, que também

ingerem os líquidos extraídos das folhas, durante a coleta e processamento (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1976; PAUL; ROCES, 2003).

Além disso, possuem uma organização social extremamente complexa. As colônias são estruturadas conforme características morfológicas diferentes (polimorfismo), denominadas de castas. Nesse sistema, os indivíduos realizam trabalhos específicos de acordo com a morfologia, idade ou estado fisiológico (DELLA LUCIA et al., 2014). Algumas castas são temporárias, como no caso das fêmeas e machos alados, observados nos ninhos somente na época do voo nupcial ou revoada. Já as castas permanentes incluem a rainha (fêmea fértil) que fundou o formigueiro e as operárias estéreis responsáveis pelos cuidados com a prole, processamento de substratos, cultivo do fungo, forrageamento e descarte de resíduos (DELLA LUCIA; SOUZA 2011).

Outra característica marcante são os seus ninhos, que apresentam um grande monte de terra solta (*murundus*) e inúmeros orifícios de entrada, internamente possuem câmaras (fungo e lixo) de diferentes volumes e formas conectadas por longos túneis que interferem na contaminação da colônia por produtos tóxicos, bem como em doses adequadas (MOREIRA et al., 2004).

3.2. Danos e prejuízos provocados por formigas-cortadeiras

As formigas-cortadeiras são consideradas importantes pragas desfolhadoras em plantas cultivadas, reflorestamentos e pastagens na região Neotropical, gerando severas perdas econômicas (DELLA LUCIA, 2003). Contudo, estimativas numéricas sobre os danos diretos por elas provocados são insuficientes e desatualizadas. No Brasil, vários desses valores se originaram de cálculos empíricos, com quantificações muitas vezes inadequadas (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

Citando alguns exemplos, foi observado que, em decorrência do ataque de *Atta sexdens* Forel, 1908 (saúva-limão) em cultivos de *Eucalyptus* e *Pinus*, o dano estimado foi de 14% (AMANTE, 1967a). Já no que diz respeito às pastagens o material forrageado correspondeu a 52,5 kg para cada 10 ninhos adultos/ha de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (saúva-parda) (AMANTE, 1967b).

Enquanto Zanetti et al. (2003) verificaram que o volume da madeira de *Eucalyptus* spp. conduzido em sistema comercial no Cerrado apresentou uma queda de 0,87% conforme a densidade de saúveiros igual a 2,76 m².

No que se diz respeito às commodities agrícolas, os danos em cana-de-açúcar chegam a três toneladas por ano, equivalente aproximado a 450 kg de açúcar ou 300 litros de álcool em um ninho/ha de *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (DOW AGROSCIENCES, 1998). Embora não existam dados conclusivos sobre as perdas para todas as culturas, pode-se afirmar que quando as plantas são jovens os prejuízos podem atingir 100% (BOARETTO; FORTI, 1997).

Os prejuízos econômicos ocasionados pelas formigas-cortadeiras têm levado ao desenvolvimento de métodos mecânicos, culturais, biológicos e químicos, visando o seu manejo integrado desde a década de 50 (BRITTO et al., 2016).

3.3. Manejo de formigas-cortadeiras

Dentre os métodos de controle, o que tem demonstrado maior eficiência é o químico, empregado na forma de iscas granuladas (BOARETTO; FORTI, 1997; NICKELE, 2008; BRITTO et al., 2016). Entretanto, segundo Forti et al. (1998), seu desenvolvimento em escala industrial, com a adição de ingredientes ativos, somente apresentou resultados satisfatórios a partir de 1960.

Durante muito tempo o ingrediente ativo mais utilizado na fabricação das iscas granuladas foi o organoclorado dodecacloro (SILVA, 2012), entretanto sua comercialização foi proibida no Brasil em 1993 (PORTARIA SDA, 1992). Além de persistente no solo e bioacumulativo (BOARETTO; FORTI, 1997; PAVANI, 2016; UNEP, 2016), é facilmente absorvido pela pele, trato respiratório e digestório humano, e provoca sintomas como desordens nervosas, problemas no fígado e câncer (SANTAMARTA, 2001).

Visando diminuir os riscos ambientais e os danos à saúde humana, se iniciou uma busca por novos ingredientes ativos que pudessem substituir o dodecacloro, resultando assim na descoberta da sulfluramida (N-etil perfluooctano sulfonamida), pertencente ao grupo químico das sulfonas fluoralfáticas, e cuja principal característica é a presença da ligação química S=O em sua estrutura (Figura 1) (BOARETTO; FORTI, 1997).

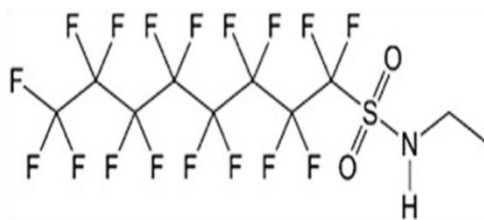


Figura 2: Estrutura molecular da sulfluramida. Fonte: CAGNETTA et al. (2017).

A sulfluramida foi primeiramente estudada no combate às formigas lava-pés (*Solenopsis invicta* Buren) nos EUA (FORTI et al., 1998), e apresenta como principais características: contaminação por ingestão e manipulação entre as operárias, ausência de odor, não repelência, modo de ação tóxico e lento, além de ser letal em baixas concentrações (BRITTO et al., 2016).

A sufluramida bloqueia o fluxo de elétrons da cadeia respiratória nas mitocôndrias, interrompendo a síntese de adenosina trifosfato (ATP). Desse modo, as operárias intoxicadas apresentam paralisia e morte por inanição, com consequente suspensão do forrageamento. A cultura de *L. gongylophorus* se desorganiza, favorecendo o surgimento de microrganismos antagonistas, que levam a colônia à morte (DELLA LUCIA et al., 2014).

Em maio de 2009, o Brasil e outros 182 países participaram da 4ª Reunião da Convenção de Estocolmo, que tratou do tema “Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs)”. Nesta, foi deliberada a incorporação do ácido perfluorooctano sulfônico (PFOS), onde se incluem compostos derivados, como a sulfluramida, e do perfluorooctano sulfonil fluoreto (PFOSF), na lista dos POPs (UNEP, 2009).

Porém, a sulfluramida é um produto indispensável à agricultura brasileira, devido a sua viabilidade técnica, custo, efetividade e disponibilidade. Não se tem previsão de uma nova molécula que possa substituir a sulfluramida pelos próximos anos (UNEP, 2016), sendo assim necessário aperfeiçoar as formas de utilização desse ingrediente ativo. Uma alternativa que se mostra promissora para viabilizar a liberação da sulfluramida é o método do encapsulamento, que tem mostrado resultados promissores nas indústrias de medicamentos e fertilizantes (SILVA, 2016).

3.4. Encapsulamento e biopolímeros no controle de pragas agrícolas

A técnica de encapsulamento consiste em formar cápsulas revestidas com biopolímeros, que liberam as substâncias de interesse de forma mais lenta, melhorando o aproveitamento e evitando perdas e danos ambientais (BRASILEIRO, 2011; SILVA, 2016).

No controle de pragas agrícolas, o método de encapsulamento promove a liberação controlada de inseticidas, redução da quantidade aplicada, diminui consideravelmente os impactos ambientais provocados pelo uso descontrolado desses agroquímicos, confere ao homem menor risco de intoxicação durante a aplicação, além de vantagens econômicas

(MATOSSO et al., 2011; CAMPOS et al., 2014). Um exemplo bem sucedido da utilização do método de encapsulamento na agricultura foi o uso de gluconato de cálcio para o encapsulamento de *Metarhizium brunneum* e *Saccharomyces cerevisiae*. O método garantiu a sobrevivência máxima destes fungos entomopatogênicos. O gluconato ainda serviu como agente nutritivo e promoveu o aumento do crescimento de micélio de *M. brunneum* (HUMBERT et al., 2017).

Buscando-se por biopolímeros (BP) que sejam biodegradáveis e com alta biocompatibilidade encontram-se a quitosana (QTS) e a tapioca (TP), que possuem tais características e ainda são provenientes de recursos renováveis (HIRANO, 1996; KUMAR, 2004; DASH et al., 2011).

A quitosana é um biopolímero extraído geralmente de crustáceos. É obtida através da desacetilação da quitina, encontrada nos exoesqueletos de crustáceos e invertebrados, como as lagostas e os caranguejos (ABDEL-FATTAL et al., 2007; USMAN et al., 2016). É formada por unidades repetidas de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-D glico-piranosose, unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) (USMAN et al., 2016).

O processo de desacetilação da quitosana acontece com a mistura desse BP com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) com condições de temperatura e pressão controladas (USMAN et al., 2016). Nele acontece a remoção de grupos acetila da cadeia da quitina, deixando na estrutura grupos amino completos, que caracterizaram a estrutura da QTS (Figura 2) (USMAN et al., 2016; ARRUDA et al., 2017). Conforme maior é o grau de desacetilação, mais pura a QTS se apresentará (ABDEL-FATTAH et al., 2007).

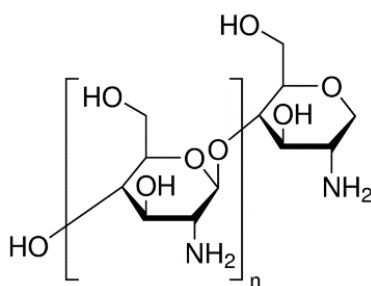


Figura 3: Estrutura molecular da quitosana de baixo peso molecular. Fonte: SIGMA-ALDRICH (2019).

Dentre as características da quitosana, a presença de ligações glicosídicas confere capacidade de formação de filmes, quando levados a um processo de abertura de suas

cadeias lineares e posterior secagem quando as cadeias se polimerizam novamente. Esse processo geralmente é feito pela gelatinização (ALMEIDA et al., 2013).

Já a tapioca é o nome dado ao amido proveniente do processamento da mandioca, vegetal abundante em regiões tropicais e muito conhecido por ser fonte de carboidratos (ATICHOKUDOMCHAI; VARAVINIT, 2003).

A tapioca é constituída por amilose e amilopectina. A amilose é um biopolímero composto por longas cadeias de D-glicose unidas através de ligações (alfa 1-4), possui cadeias longas, o teor dessa substância presente na tapioca varia entre 17% a 20% (Figura 3-A). Já a amilopectina é o principal componente da tapioca, seu teor pode variar de 70 a 80%. É um biopolímero ramificado, já que se trata de alfa 1-4 glucano com ponto de ramificação em alfa 1-6 (Figura 3-B) (CHUNG; LIU, 2009; MASRI et al., 2013).

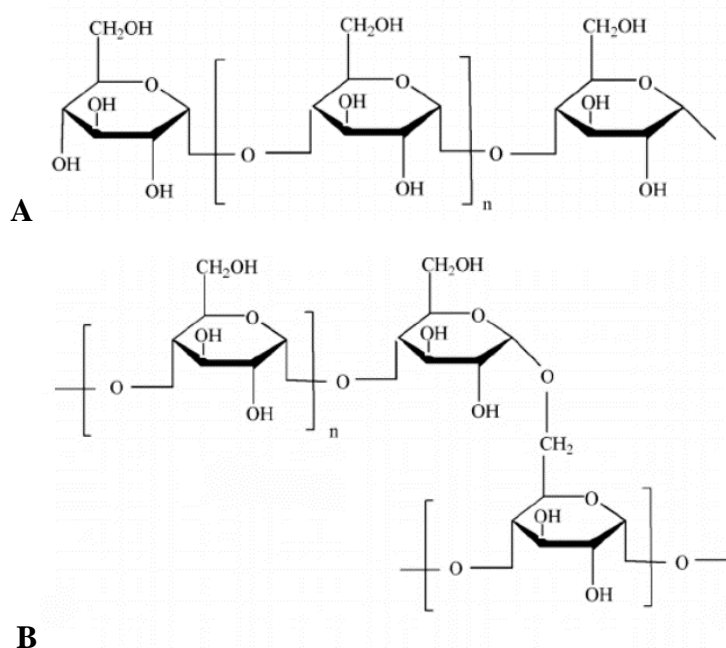


Figura 4: A) Estrutura molecular da amilose. B) Estrutura molecular da amilopectina. Fonte: ISMAIL et al. (2013).

O filme com aspecto líquido é obtido com a gelatinização através do aquecimento a 70°C da solução aquosa de tapioca. Quando a tapioca entra em contato com água acaba perdendo sua condição cristalina e, após o aquecimento, torna-se transparente e viscosa (MASRI et al., 2013). Esse amido possui propriedades como biodegradabilidade e alta

solubilidade em água, além de possuir custo relativamente baixo (BOBBIO; BOBBIO, 2003; VIÉGAS, 2016).

3.5. Seleção de substratos pelas formigas-cortadeiras

O desenvolvimento da cultura de *L. gongylophorus* está diretamente ligado ao substrato fornecido pelas formigas-cortadeiras. O fungo é alimento exclusivo das larvas e parte da alimentação das operárias, que por sua vez, também dependem do corte de folhas e extravasamento de seiva como fonte energética (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1976; PAUL; ROCES, 2003).

As operárias são extremamente criteriosas quanto à seleção do substrato, pois conseguem detectar odores emitidos pelas plantas através de suas antenas e ainda possuem memória olfativa que interfere na escolha para aceitar ou rejeitar o material vegetal a ser forrageado (ARENAS; ROCES, 2016).

Outros fatores, como a presença de compostos secundários repelentes (p. ex.: taninos), existência de barreira física (p. ex.: tricomas), teor de umidade e rigidez nas folhas, e valor nutricional, influenciam na seleção do substrato (FOWLER; ROBINSON, 1979; DELLA LUCIA, 2011).

Após o carregamento das folhas, iniciam-se os atos comportamentais de processamento, que são similares aos realizados com as iscas granuladas. Durante o ato de transportar e lambe é que as operárias se contaminam por ingestão (ANDRADE et al., 2002). Por esse motivo, o controle químico se mostra o mais eficiente e comumente utilizado (BOARETTO; FORTI, 1997; ZANETTI, 2014).

4. REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, W.I.; JIANG, T.; EL-BASSYOUNI, G.E.-T.; LAURENCIN, C.T.; Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.3, p.503-514, 2007.

ALMEIDA, D. M.; WOICIECHOWSKI, A. L.; WOSIACKI, G.; PRESTES, R. A.; PINHEIRO, L. A.; Physical, chemical and barrier properties in films made with bacterial cellulose and potato starch blend. **Polimeros**, v.23, p.538-546, 2013.

AMANTE, E. Prejuízos causados pela formiga saúva em plantações de *Eucaliptus* e *Pinus* no Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, v.6, p.335-363, 1967a.

AMANTE, E. Saúva tira boi da pastagem. **Coopercotia**, v.23, n.207, p.340, 1967b.

ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A.A; BOARETTO, M.A.C.; RAMOS, V.M.; MATOS, C.A.O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, v.40, n.2, p.293–306, 2002.

ARENAS, A.; ROCES, F. Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. **Animal Behaviour**, v.115, p.167–174, 2016.

ARRUDA, I.N.Q.; PEREIRA, V.A.; STEFANI, R. Application of chitosan matrix for delivery of rutin. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v.14, p.561-566, 2017.

ATICHOKUDOMCHAI, N.; VARAVINIT, S. Characterization and utilization of acid-modified cross-linked Tapioca starch in pharmaceutical tablets. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 263–270, 2003.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v.20, n.1, p.1–6, 1995.

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

BOBBIO, O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a química dos alimentos**. LivrariaVarela. São Paulo, 2003.

BOLTON. An online catalog of the ants of the World. 2018. Disponível em: <http://www.antcat.org/catalog/429011?include_full_statistics=true>. Acesso em: 22 abr. 2018.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria SDA n. 91, de 30 de novembro de 1992.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa. Paraíba, 2011.

BRITTO, J. S. DE; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A. DE; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P.G.; CAMARGO, R. S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Reserch in Environmental Studies**, v.3, p.11–92, 2016.

BUTELER, M.; LOPEZ GARCIA, G.; STADLER, T. Potential of nanostructured alumina for leaf-cutting ants *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) management. **Austral Entomology**, p. 292–296, 2017.

CAGNETTA, G.; ZHANG, Q.; HUANG, J.; MENGAN, L.; BIN, W.; YUJUE, W.; SHUBO, D.; GANG, Y. Mechanochemical destruction of perfluorinated pollutants and

mechanosynthesis of lanthanum oxyfluoride: A Waste-to-Materials process. **Chemical Engineering Journal**, v.316, p.1078–1090, 2017.

CAMPOS, E.V.R.; OLIVEIRA, J.; FRACETO, L. Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A Review. **Advanced Science, Engineering and Medicine**, v. 6, n. p.1–15, 2014.

CHUNG, H. J.; LIU, Q. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. **Carbohydrate Polymers**, v.77, n.4, p.807–815, 2009.

DASH, M.; CHIellini, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v.36, n.8, p.981–1014, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C. Hormigas de importancia econômica en la región Neotropical. In: FERNANDEZ, F. (Ed.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Colombia: Instituto Bogotá. 2003. p.337–349.

DELLA LUCIA, T.M.C.; SOUZA, D.J. Importância e história de vida das formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p.13-26.

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

DOW AGROSCIENCES. **Controle de formigas cortadeiras**. 1998. (folheto).

ESTRADA, C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; BAEL, S. A. V. A. N. Fungal endophyte effects on leaf chemistry alter the in vitro growth rates of leaf-cutting ants' fungal mutualist, *Leucocoprinus gongylophorus*. **Fungal Ecology**, v.8, p.37–45, 2014.

FORTI, L.C.; NAGAMOTO, N.S.; PRETTO, D.R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998, p.113-132.

FOWLER, H.G.; PAGANI, M.I.; SILVA, O.A.; FORTI, L.C.; SILVA, V.P.; VASCONCELOS, H.L. A pest is a pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v.13, p.671-675, 1989.

FOWLER, H. G.; ROBINSON, S. W. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. **Ecological Entomology**, v.4, n.3, p.239–247, 1979.

GRIMALDI, D.; AGOSTI, D.; CARPENTER, J. M. New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera: Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationships. **American Museum Novitates**, v.3208, p.1-43, 1997.

HUMBERT, P.; PRZYKLENK, M.; VEMMER, M.; PATEL, A. V. agents AC. **Journal of Microencapsulation**, v.34, n.1, p.47-56, 2017.

HIRANO, S. **Applications of chitin and chitosan in the Ecological and Environmental Fields**. New York. CRC Press, 1997.

ISMAIL, H.; IRANI, M.; AHMAD, Z. Starch-based hydrogels: present status and applications. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. v. 62, n. 7, p. 411-420, 2013.

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, n.12, p.6017–6084, 2004.

LITLEDYKE, M.; CHERRETT, J. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.66, p.205-217, 1976.

MASRI, M. N.; NAZERI, M. F. M.; NG, C. Y.; MOHAMAD, A. A. Tapioca binder for porous zinc anodes electrode in zinc–air batteries. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v.27, n.2, p.217–224, 2015.

MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. O.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*. - **Biology Letters**, v.80. n.80, p. 461–464. 2012.

MOREIRA, A. A.; FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C.; ANDRADE, A. P. P.; LOPES, J. F. S.; RAMOS, V. M. External and internal structure of *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) nests. **Journal of Applied Entomology**, v.128, p.204–211, 2004.

MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; BACCI JR, M. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. **Molecular Ecology**, n.26, p.6921-6937, 2017.

NICKELE, M. A. **Distribuição espacial, danos e planos de amostragem de *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) em plantios de Pinus taeda L. (Pinaceae)**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PAVANI, N. D. Pesticidas: Uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. **Universidade Estadual Paulista**, p.1–64, 2016.

PAUL, J.; ROCES, F. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. **Journal of Insect Physiology**, v.49, n.4, p.347-357, 2003.

SANTAMARTA, J. Por um futuro sem contaminantes orgânicos persistentes. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.2, n.1, p.46, 2001.

SIGMA ALDRICH Products. Chemical & Biochemical Product. 2019.

SILVA, A. M. Filmes biodegradáveis de amido contendo compostos ativos encapsulados e nanopartículas: uma revisão. 2016.

SILVA, M.S. **Ação tóxicas de ingredientes ativos em *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) visando o emprego em iscas formicidas.** 2012.86f. Tese (Programa de Pós- Graduação em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012.

UNEP. Comissão de Revisão dos Poluentes Orgânicos Persistentes. Perfluorooctane sulfonate: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, 2016, Rome. UNEP/POPS/POPRC.12/INF/15/Rev.1).

UNEP. Comissão de Revisão dos Poluentes Orgânicos Persistentes. Perfluorooctane sulfonate: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, 2009, Geneva. UNEP/POPS/POPRC.2/17/Add.5.

URBAS, P.; ARAUJO, M.V.; LEAL, I.R.; WIRTH, R. Cutting more from cut forests: edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in Brazil. **Biotropica**, v.39, p.489–495, 2007.

USMAN, A.; ZIA, K.M.; ZUBER, M.; TABASUM, S.; REHMAN, S.; ZIA, F. Chitin and chitosan based polyurethanes: a review of recent advances and prospective biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.86, p.630-645, 2016.

VIÉGAS, L. P. **Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de amido com quitosana para aplicação em embalagens de alimentos.**2016. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; VILELA, E. F. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Sociobiology**, v.42, n.3, p.433–442, 2003.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, SANTOS, J.C.; SILVA, W.L.P.; RIBEIRO, G.; LEMES, P.G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v.5, n.3, p.439–454, 2014.

CAPÍTULO I

Síntese de encapsulados à base de quitosana e tapioca para o controle de formigas-cortadeiras

RESUMO

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae, Attini) são pragas importantes em áreas agrícolas e reflorestamentos na região Neotropical, gerando severas perdas econômicas. O desafio atual visando o controle é a busca por novos métodos de liberação da sulfluramida. Neste contexto, o método de encapsulamento é uma técnica promissora e ainda pouco estudada para o controle dessas formigas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um encapsulado à base de quitosana e tapioca para o controle de *Atta sexdens*. Primeiramente, as soluções de quitosana (Sigma-Aldrich) a 3% e tapioca comercial a 1% foram agitadas em um béquer com um bastão de vidro. Em seguida, a solução de acetona e sulfluramida foi adicionada gradualmente sob agitação constante e posteriormente gotejada em solução de NaOH e, após o processo de precipitação, os encapsulados foram submetidos à secagem em estufa a 50°C por 4 horas. A fim de confirmar a presença da sulfluramida no encapsulado e caracterizar aspectos como cristalinidade e morfologia foram feitas análises de espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração por raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na análise FTIR o grupo funcional identificado que caracteriza a sulfluramida é o S=O nos números de onda 1.203 e 1.366 cm^{-1} , que também foram observados nos encapsulados. Na análise de DRX foram observados picos de cristalinidade semelhantes entre os encapsulados com 2% de ingrediente ativo e a sulfluramida. Na análise de MEV os encapsulados apresentaram área superficial com aspecto granulado, com lâminas longas afiladas. Também foi observada a presença de escamas, característica frequentemente observada nos encapsulados com 10% (m/v) de sulfluramida. De acordo com as caracterizações realizadas por FTIR, DRX e MEV, os encapsulados sintetizados à base de quitosana e tapioca contendo 2% (m/v) de sulfluramida apresentaram ingrediente ativo, e foram devidamente caracterizados.

Palavras-chave: biopolímeros; quitina; *Atta sexdens*; encapsulamento; sulfluramida.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini) are important pests in agricultural areas and reforestation in the Neotropical region, generating severe economic losses. The current challenge for control is the search for new methods of releasing sulfluramide. In this context, the encapsulation method is a promising technique and still little studied for the control of these ants. Therefore, the objective of this work was to develop and characterize a chitosan and tapioca based encapsulation for the control of *Atta sexdens*. First, solutions of chitosan (Sigma-Aldrich) 3% and commercial tapioca 1% were shaken in a beaker with a glass stick. The acetone and sulfluramide solution was then gradually added under constant stirring and then dripped in NaOH solution and, after the precipitation process, the packages were subjected to oven drying at 50°C for 4 hours. In order to confirm the presence of sulfluramide in the encapsulation, and to characterize aspects such as crystallinities, and morphology, Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). In the FTIR analysis the identified functional group that characterizes the sulfluramida is the S = O in the wavelengths 1,203 and 1,366 cm^{-1} , that also were observed in the encapsulados. In the XRD analysis, similar crystallinity peaks were observed between the encapsulated 2% active ingredient and sulfluramide. In the SEM analysis, the encapsulates have a granular aspect surface area, with sharp long blades. The presence of scales was also observed, a characteristic frequently observed in encapsulated with 10% (m/v) of sulfluramide. According to the characterizations made by FTIR, DRX and MEV, the synthesized encapsulates based on chitosan and tapioca containing 2% (m/v) of sulfluramide presented active ingredient, and were properly characterized.

Keywords: biopolymers; chitin; *Atta sexdens*; encapsulation; sulfluramide.

1. INTRODUÇÃO

O controle de formigas-cortadeiras é realizado principalmente com o emprego de iscas granuladas compostas por material atrativo e ingrediente ativo. O ingrediente atrativo mais utilizado na fabricação de iscas é a polpa cítrica (CARLOS et al., 2009). A polpa possui alta porcentagem de carboidratos, sendo ideal para o desenvolvimento do fungo cultivado pelas formigas-cortadeiras de eudicotiledôneas (BOARETTO; FORTI, 1997). Já o ingrediente ativo deve apresentar características como, contaminar as operárias por ingestão, ausência de odor e repelência, ação tóxica e ser letal em baixas concentrações. Atendendo esses critérios, o mais utilizado para síntese das iscas é a sulfluramida (BRITTO et al., 2016).

A sulfluramida (N-etil perfluooctano sulfonamida) integra o grupo químico das sulfonas fluoralifáticas. Age bloqueando a síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) nas mitocôndrias, provocando paralisia e, conseqüentemente, a morte do inseto (BOARETTO; FORTI, 1997). Entretanto, em 2009, a sulfluramida foi classificada como um poluente orgânico persistente (POPs) na Conferência de Estocolmo e, até então, não existe outra molécula registrada com a mesma eficiência que possa compor as iscas granuladas (UNEP, 2016).

Neste contexto, o desafio atual no controle de formigas-cortadeiras é a busca por novos ingredientes ativos ou formas de liberação. Uma alternativa que se mostra viável é o método de encapsulamento, utilizado na medicina e na indústria de fertilizantes para a liberação controlada de compostos de interesse, e que está sendo inserida no mercado de pesticidas (BRASILEIRO, 2011; SILVA, 2016).

Na agricultura, o método confere vantagens, pois pode reduzir os riscos de intoxicação durante a aplicação de pesticidas, liberação controlada de ingredientes ativos e, principalmente, minimizar os danos ambientais motivados pelo uso desses insumos (MATTOSO et al., 2011).

Demonstrando a possibilidade de uso de encapsulados no controle biológico de pragas, Tamez-Guerra et al. (2000) fabricaram encapsulados de amido e lignina. Os mesmos aumentaram a resistência à ação da chuva e luz solar de baculovírus (vírus da poliedrose nuclear) no controle de *Trichoplusia ni* Hübner.

Também foram realizados estudos com os biopolímeros alginato de sódio, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e quitosana, visando o microencapsulamento de *Metarhizium anisopliae*. Foi observado que conídios microencapsulados apresentaram

germinação de 80% após seis meses de armazenamento, enquanto conídios não encapsulados apresentaram taxa inferior a 50%, sob as mesmas condições de armazenagem (LIU; LIU, 2009).

Para a fabricação de encapsulados geralmente são utilizados biopolímeros, pois possuem propriedades desejáveis, como alta biocompatibilidade, são biodegradáveis, e apresentam baixa toxicidade para as comunidades biológicas (DASH, et al., 2011; SILVA, 2016). Neste sentido, biopolímeros muito utilizados no método de encapsulamento são a quitosana e a tapioca (HIRANO, 1996; KUMAR, 2004; DASH, et al., 2011). Portanto, o objetivo deste capítulo foi estabelecer um protocolo de síntese e caracterizar encapsulados à base de quitosana e tapioca contendo sulfloramida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção de encapsulados à base de quitosana e tapioca

Foi formulado um protocolo inédito, adaptado do método de Arruda (2016) para a produção dos encapsulados descritos neste trabalho. Tais encapsulados foram produzidos no Laboratório de Sensores, Nanomedicina e Materiais (LS-Nano) da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras.

A quitosana com 75-80% de desacetilação foi obtida da empresa Sigma-Aldrich[®], o NaOH perolado da Lafan[®], a acetona pura 100% da empresa Synth[®], o ácido acético glacial (P.A. - ACS) da Dinâmica Química Contemporânea[®], a sulfloramida pura foi doada pela empresa Dominus Química Ltda[®] e a tapioca adquirida em comércio local. Para auxiliar a formação do encapsulado utilizou-se um agitador magnético modelo Biomixer Am-10[®] e uma bureta de 50 mL. Todas as soluções foram preparadas com água purificada através do sistema Purelab modelo classifi.

A solução de quitosana foi preparada a partir de 3 g de quitosana dissolvida em 100 mL de solução de ácido acético 1% (v/v), sendo agitada durante 4 h a temperatura ambiente para completa dissolução. A dispersão de tapioca foi obtida através da dissolução de 1 g em 100 mL de solução de ácido acético 5% (v/v). A mistura, que estava sob frequente agitação, foi aquecida até o ponto de fervura por 2 minutos e mantida a temperatura constante de 85°C durante 1 h, no qual se aferiu a temperatura a cada 5 minutos. Já a solução de sulfloramida foi preparada a partir de 0,2 g de ingrediente ativo puro dissolvido em 10 mL de acetona pura, até ocorrer dissolução completa.

Para preparar o encapsulado (Figura 1) utilizou-se 30 mL da solução de quitosana (3%), em seguida foi adicionado 9 mL da solução de tapioca (1%), acrescentando por fim 6 mL da solução de acetona e sulfluramida (2%). Esses processos foram realizados de forma gradativa e sob agitação manual, visto que sem os cuidados necessários houve formação de grumos na mistura. Enfim, a solução total foi gotejada em 190 mL de solução de NaOH 1Mol/L, sob agitação constante.

Após o gotejamento, os encapsulados em formato esférico, foram retirados da solução com auxílio de peneira de aço inox ($\varnothing=10$ cm), e secos em estufa durante três dias com temperatura em torno de 50°C para posterior caracterização (Figura 1).

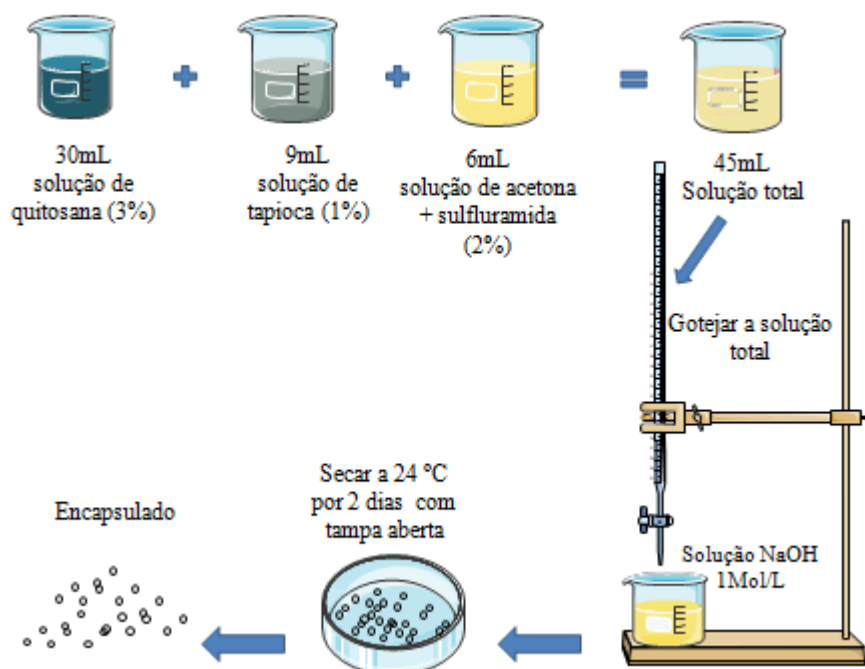


Figura 1: Produção do encapsulado de quitosana e tapioca com a adição de sulfluramida dissolvida em acetona.

2.2. Caracterização dos encapsulados contendo sulfluramida

2.2.1. Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a validação do encapsulado foi necessário realizar caracterizações químicas, dentre elas a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*. Esse método permite analisar os grupos funcionais e ligações químicas que compõem a amostra por meio de espectros, sendo possível identificá-los através de determinados números de ondas

(LOPES; FASCIO 2004). As principais vantagens no uso desta técnica são a rapidez das análises e a não destruição da amostra.

Para realizar as análises foram produzidos encapsulados com 0, 2 e 10% (m/v) de sulfluramida. As amostras foram analisadas pela técnica de pastilha, sendo maceradas, prensadas e misturadas com brometo de potássio (KBr) (Figuras 2A e 2B), e levadas ao aparelho para leitura (Figura 2C).

O equipamento utilizado para as análises foi o TENSORII da marca Bruker®, que possui tecnologia DigiTect™ para diminuir ruídos e dois canais de 24 bits que pré-amplificam o detector; os gráficos com espectros foram gerados no software Opus75® para a análise das curvas de intensidade transmitidas em função do número de onda, com modo de absorbância de 400 a 4.000 cm^{-1} .

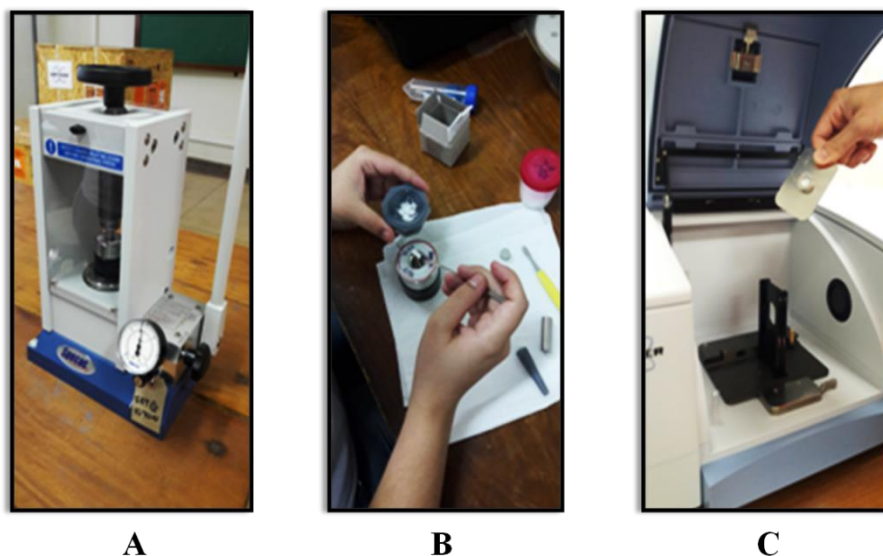


Figura 2: A) Preparação da amostra para formação da pastilha de KBr. B) Retirada da pastilha de KBr. C) Alocação da pastilha de KBr no aparelho para leitura de infravermelho.

2.2.2. Difração de Raios-X (DRX)

É uma análise no qual é possível observar a estrutura cristalina dos materiais (MORELLI; RUVOLO FILHO, 2010). Para análises de difração de raios-X (DRX) as medidas foram feitas com encapsulados com 0, 2 e 10% (m/v) de sulfluramida. Para isso, os encapsulados foram acondicionados em placas de Petri durante três dias na estufa com temperatura em torno de 50°C para completa secagem.

Em seguida, as amostras foram maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo, até a obtenção, quando possível, de um pó fino. Tanto a quitosana quanto a tapioca foram acomodadas em uma superfície lisa durante três dias a temperatura ambiente (25°C) para a secagem, formação e desprendimento do filme. A sulfluramida não sofreu nenhum tratamento prévio.

Os gráficos foram gerados por meio de um difratômetro de raios-X da marca Riga-ku®, modelo Miniflex II, com fonte de radiação de CuK α (0,15406 nm), na faixa de $2\theta = 3^\circ$ a 90° e passo de $0,02^\circ$, além de tempo de scan de $10^\circ \text{ min}^{-1}$.

2.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) permite fazer a caracterização morfológica e microestrutural em alta resolução de amostras sólidas (DEDAVID et al., 2007). Para as análises foram fabricados encapsulados de quitosa e tapioca com 0, 2 e 10% (m/v) de sulfluramida. Foram dispostos em placas de Petri e secos em estufa por três dias a 50°C.

As análises de MEV foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura XL-30 FEG Philips® localizado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) foram feitos de forma a identificar os grupos funcionais presentes em todos os compostos químicos utilizados, visto que o número de onda é característico para cada grupo. Esta análise é importante a fim de entender se os grupos funcionais apresentados pelos espectros pertencem realmente à cada composto químico utilizado.

Foram utilizados encapsulados contendo 2% (m/v) de sulfluramida para os testes com as formigas, pois foi a concentração mais baixa detectável pelos equipamentos de caracterização. Também foram fabricados encapsulados contendo 10% (m/v) do ingrediente ativo para melhorar a precisão das análises, pois concentrações abaixo de 2% (m/v) não apresentaram grupos funcionais característicos da sulfluramida nos respectivos espectros.

A análise de FTIR (Figura 3) possibilitou, portanto constatar a presença da banda referente a CH_3COH em 848 cm^{-1} , que foi observado nos espectros referentes ao encapsulado sem sulfluramida (preto), encapsulados com 2% (m/v) de sulfluramida (verde) e sulfluramida (vermelho) (Figura 3). Segundo Bandeira et al. (2002) a presença dessas ligações entre as bandas $3.292\text{-}1.135\text{ cm}^{-1}$ são características de grupos hidroxila de alcoois.

Já as ligações C-O-C (éter) entre 1.022 e 1.152 cm^{-1} , provenientes das ligações glicosídicas, foram observados nos encapsulados 2% (m/v) (verde) e 10% (m/v) (azul), além da própria sulfluramida (vermelho). Segundo Zimmermann et al. (2014), a presença de C=O na banda 1.058 cm^{-1} caracteriza a presença de carbonila.

A banda de estiramento S=O em 1.203 e 1.366 cm^{-1} foi somente constatada para o encapsulado de 10% (m/v) (azul) e para a própria sulfluramida (vermelho). Segundo Zhang (2013), a sulfluramida é um derivado do ácido perfluorooctanossulfônico (PFOS) que possui banda de leitura típica em torno de $1.200\text{-}1.350\text{ cm}^{-1}$, confirmando então a presença do ingrediente ativo nos encapsulados produzidos neste trabalho.

A deformação angular do CH_2 em 1.446 cm^{-1} foi identificada apenas no espectro do encapsulado sem ingrediente ativo (preto) e no encapsulado 2% (m/v) (verde), caracterizando uma das bandas presentes na tapioca (DEEYA et al., 2013).

Foi observado NH de dobramento em 1.577 cm^{-1} nos espectros de ambos os encapsulados (verde e azul) assim como no espectro obtido para sulfluramida (vermelho). Segundo Vaz et al. (2015), os dobramentos NH próximos à banda de 1.540 cm^{-1} sugerem a existência de grupos amino.

Enquanto o grupo C=O em 1.685 cm^{-1} foi somente constatado no espectro obtido para o branco (preto), referente à acetilação da quitosana (Figura 3) (PAWLAK; MUCHA, 2003; PAIVA et al., 2009).

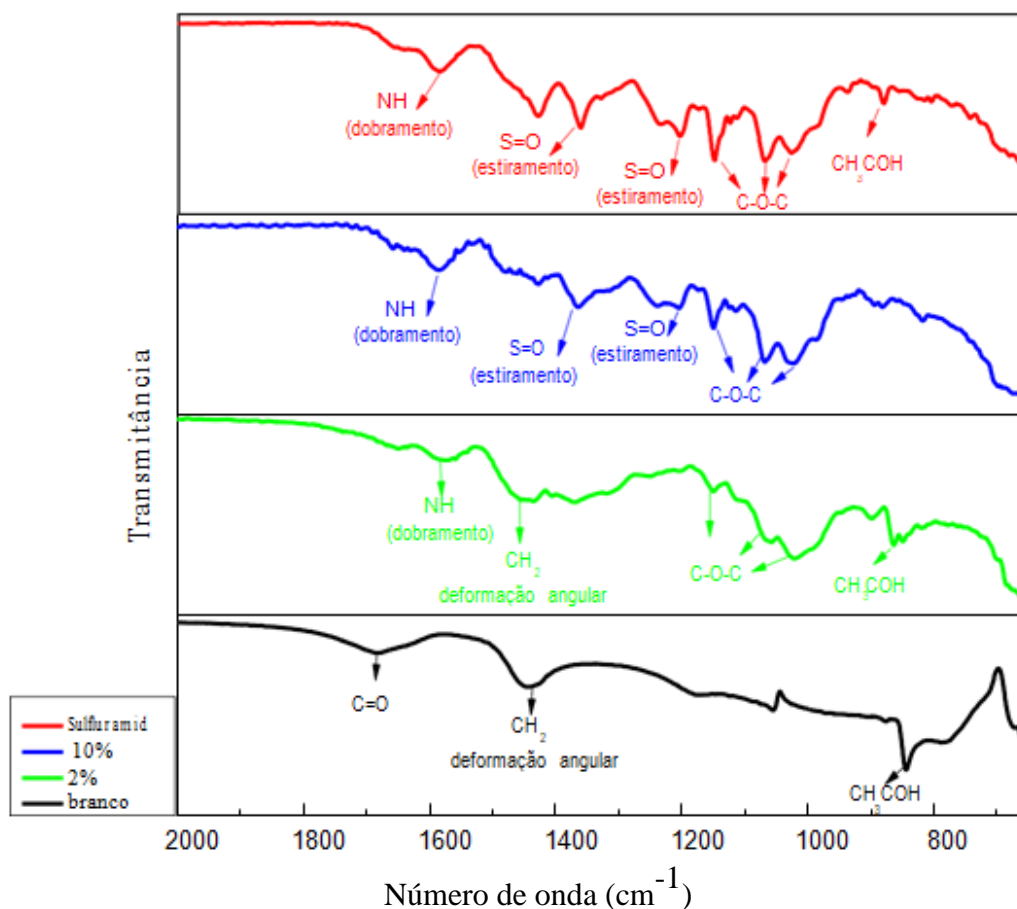


Figura 3: Espectros de infravermelho dos encapsulados sem ingrediente ativo, com 2, 10 % de sulfluramida e sulfluramida pura.

Apesar de não encontrar CH₃COH, C-O-C e NH na estrutura molecular da sulfluramida (Figura 3), esses grupos funcionais estavam presentes no material usado como ingrediente ativo de uso comercial. Como o grau analítico do material não foi aferido não é possível dizer a origem desses grupos químicos.

3.2. Difração de Raios-X (DRX)

A técnica de difração de raios-X foi realizada com a finalidade de compreender como são manifestadas as fases cristalinas dos materiais e encapsulados utilizados no estudo. As figuras 4, 5 e 6 representam os difratogramas obtidos para o filme de quitosana, filme de tapioca, pó de quitosana com tapioca, sulfluramida e pó dos encapsulados contendo 2 e 10% (m/v) de sulfluramida.

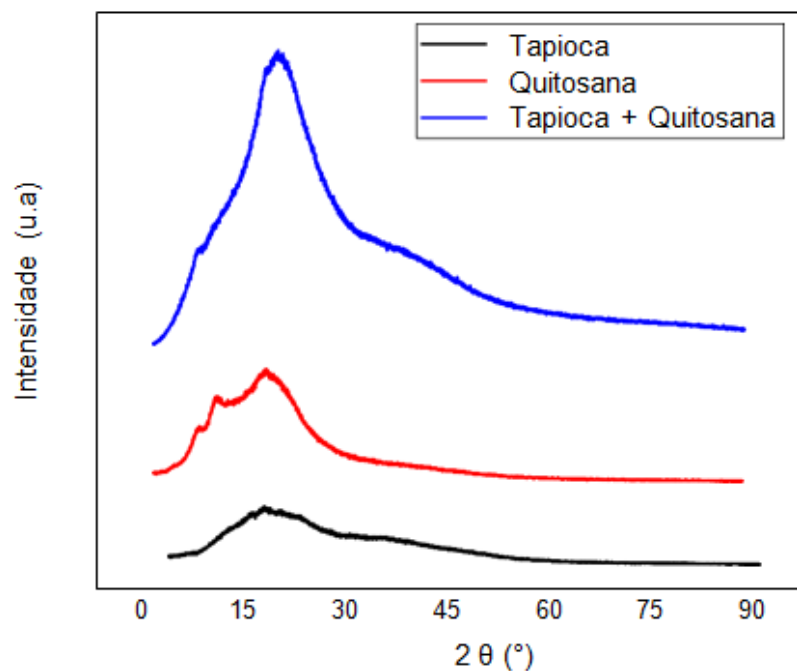


Figura 4: Difratoqramas de raio-X obtidos para tapioca (preto), quitosana (vermelho) e mistura de quitosana com tapioca (azul).

Segundo os difratogramas, o filme de tapioca (preto) não se mostra cristalino, visto que o processo de síntese da dispersão de tapioca envolve a alteração da estrutura cristalina dos biopolímeros presentes a fim de aumentar a solubilidade da mesma (SILVA, 2006), enquanto que o filme de quitosana (vermelho) apresentou três picos, sendo dois muito próximos em 2θ ($^\circ$) = 9,50 e 12,0 e outro em 2θ ($^\circ$) = 19,5. Os valores dos picos obtidos no filme de quitosana mostraram-se bem próximos aos dois picos obtidos na literatura para quitosana em pó (PAWLAK; MUCHA; 2003). O difratograma da quitosana em conjunto com a tapioca (azul) mostrou semelhança comparada aos difratogramas discutidos anteriormente.

A sulfloramida (Figura 4) (azul) apresentou diversos picos na região em que 2θ variou de 3 a 50° . Como a intensidade de picos obtida para este material é muito maior do que para os encapsulados, visto que a amostra se encontrava pura, as análises foram divididas em duas figuras a fim de observar melhor os resultados obtidos.

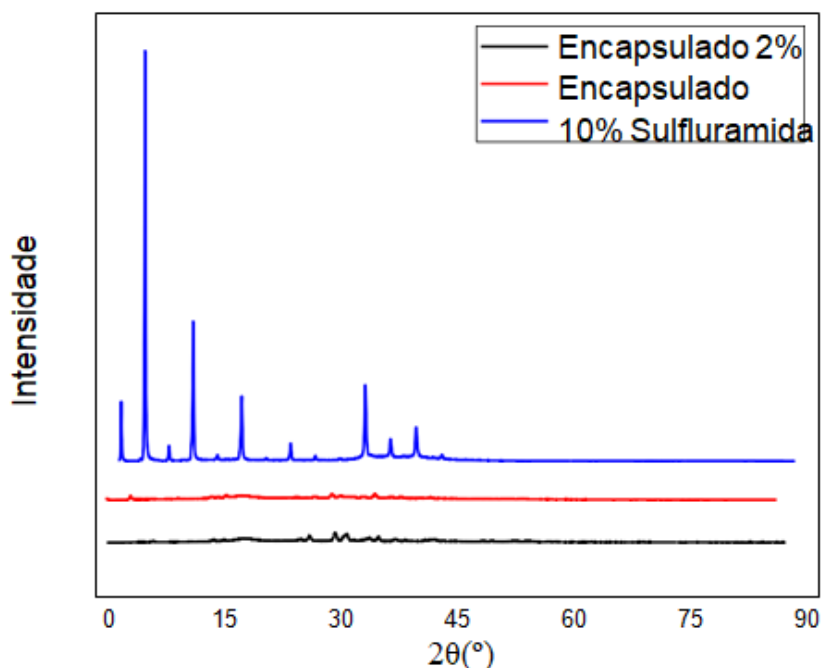


Figura 5: Difratogramas de sulfloramida (azul), encapsulado 10% (vermelho) e encapsulado 2% (preto).

Ao comparar os difratogramas percebeu-se que o encapsulado 10% (vermelho) apresentou picos semelhantes à sulfloramida (azul) em 2θ próximo de 3,15; 6,23; 12,4; 18,6; 27,6; 28,0 e 41,3. Para o encapsulado 2% (preto) os picos foram semelhantes em 2θ próximo de 16,8; 21,5; 37,9 e 39,9. Por fim, ao verificar os resultados dos encapsulados 2 e 10% os picos variaram com 2θ entre 3 a 60° (Figura 6).

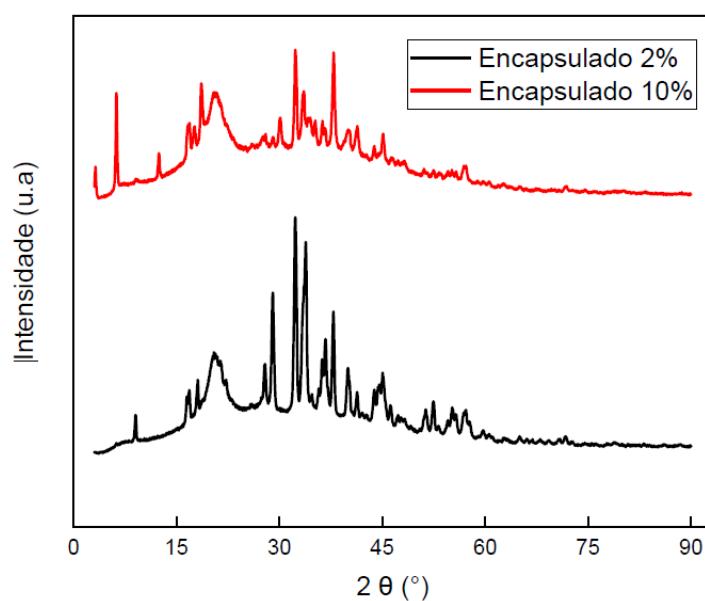


Figura 6: Difratogramas de encapsulado 10% (vermelho) e encapsulado 2% (preto).

Os difratogramas apresentaram semelhanças em 2θ próximo de 16,6; 20,7; 29,0; 32,3; 36,2; 36,7; 37,8; 40,0; 41,3; 43,8; 45,1 e 57,2. Muitos dos picos observados para os encapsulados possivelmente são provenientes da formação de sais no mesmo, uma vez que, tanto a quitosana quanto a tapioca são solúveis em meio ácido e a formação dos encapsulados se dá através do gotejamento dos compostos em meio básico.

3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV permite a caracterização morfológica de amostras secas, tornando visível seu aspecto físico superficial. As interpretações de imagens foram realizadas com o auxílio de Dedavid et al. (2007).

3.3.1. Encapsulados compostos por quitosana e tapioca

Na figura 7 é apresentada a característica superficial de encapsulados compostos somente por quitosana e tapioca. É possível observar que a superfície tem aspecto de grânulo e as lâminas são longas e finas. Essa característica se deve pela presença de quitina, principal componente da quitosana, aspecto que também foi observado por Paulino et al. (2006).

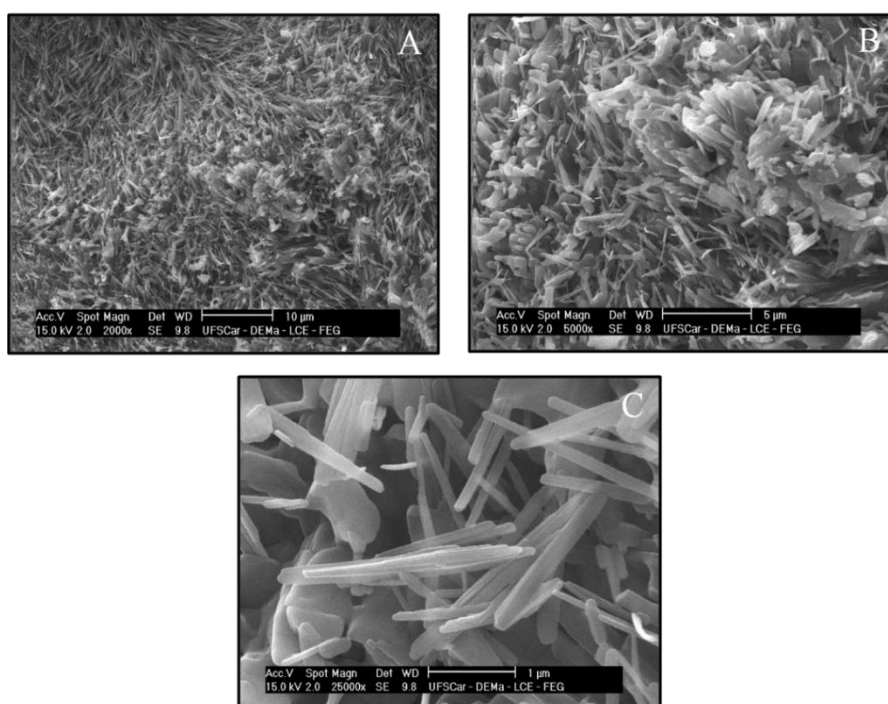


Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície de encapsulados compostos por quitosana e tapioca. A) resolução de 10 μm . B) resolução de 5 μm . C) resolução de 1 μm .

3.3.2. Encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 2% (m/v)

Na figura 8, a fotomicrografia representa os encapsulados contendo quitosana, tapioca e sulfluramida a 2% (m/v). É possível observar que superfície é muito semelhante aos encapsulados da figura 7.

Os encapsulados também possuem área superficial com aspecto granulado (Figura 8A), com lâminas longas afiladas (Figura 8D), característica primordial da quitosana. Também foi observada a presença de escamas (Figura 8C).

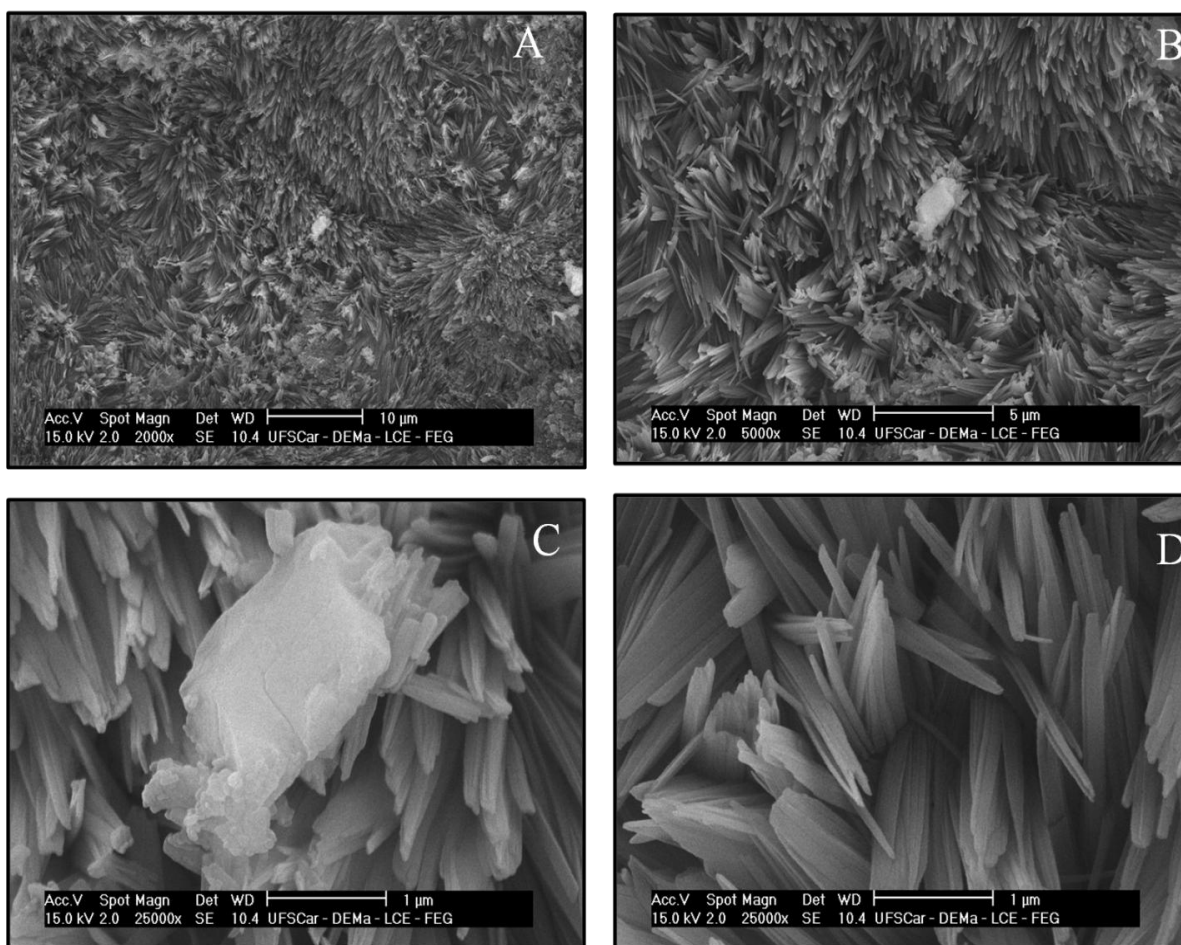


Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredurade da superfície de encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 2% (m/v). A) resolução de 10 µm. B) resolução de 5 µm. C) resolução de 1µm. D) resolução de 1µm das demais lâminas.

3.3.3. Encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 10% (m/v)

As fotomicrografias correspondentes aos encapsulados contendo sulfluramida a 10% (m/v) também possuem superfície laminar com folhas longas e finas, devido a presença de quitosana (Figura 9). Nas figuras 9B e 9C é possível observar uma escama

em meio ao material laminar. Esta característica também pôde ser observada nos encapsulados com sulfluramida a 2% (m/v) (Figura 8C).

Segundo Guo et al. (2017), esse aspecto escamoso se deve a presença de compostos perfluorooctanossulfonatos (PFOS). A presença de escamas só foi passível de observação devido à maior concentração de sulfluramida.

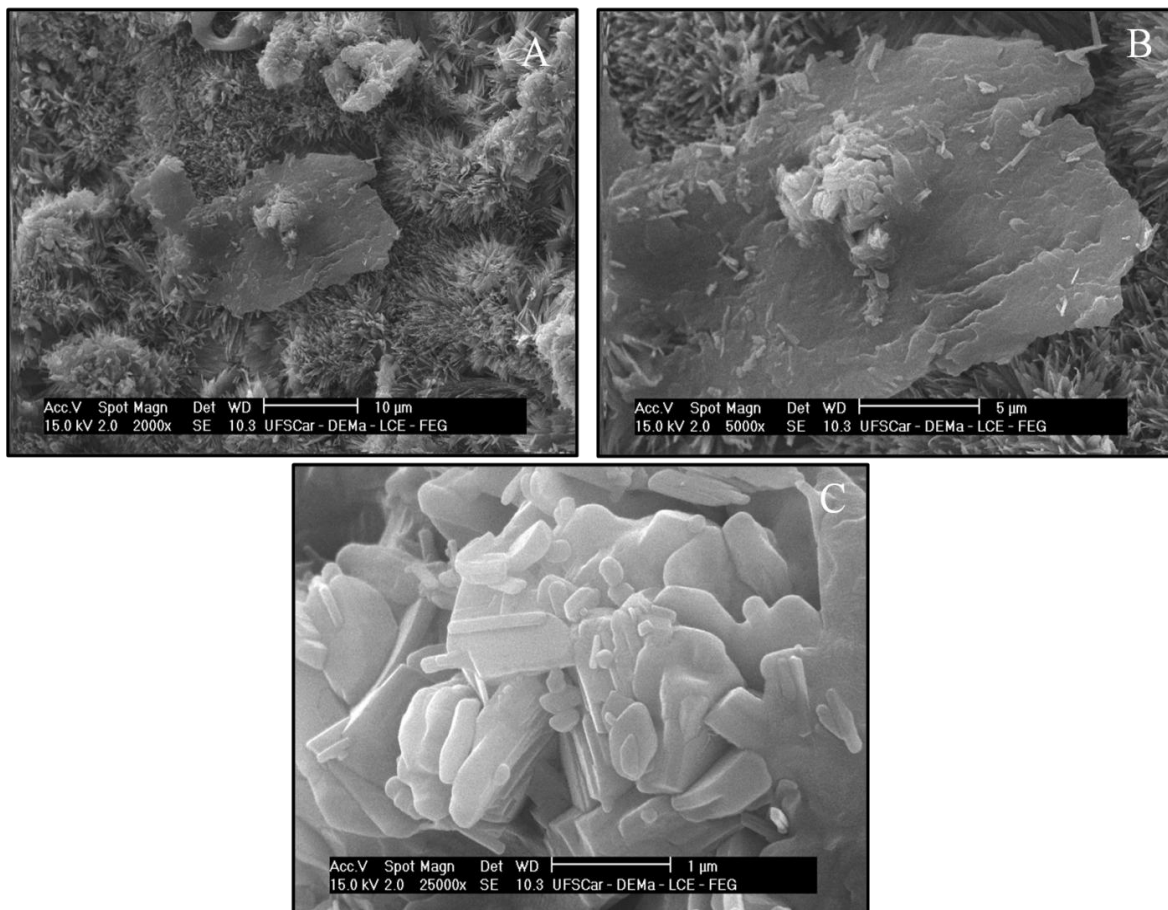


Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície de encapsulados compostos por quitosana, tapioca e sulfluramida a 10% (m/v). A) resolução de 10 µm. B) resolução de 5 µm. C) resolução de 1 µm.

4. CONCLUSÕES

O protocolo de síntese de encapsulados à base de quitosana e tapioca foi estabelecido e, segundo as análises de FTIR, DRX e MEV, os encapsulados analisados apresentam sulfluramida nas concentrações/doses analisadas.

5. REFERÊNCIAS

ARRUDA, I. N. Q.; PEREIRA, V. A.; STEFANI, R. Application of chitosan matrix for deli- very of rutin. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v.14, p.561-566, 2017.

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L. TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum*. **Química Nova**, v.25, n.6, p.1078–1080, 2002.

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

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioactivos: inovação em diferentes áreas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa. Paraíba, 2011.

BRITTO, J. S. DE; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A. DE; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; CAMARGO, R. S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Reserch in Environmental Studies**, v.3, p.11–92, 2016.

CARLOS, A. A.; FORTI, L. C.; CAMARGO, R. S.; MOREIRA, S. M.; VERZA, S. S. DINIZ, A.R. Attractiveness of different citrus pulps to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.54, n.3, p.799–805, 2009.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v.36, n.8, p.981–1014, 2011.

DEEYA, P.; SUPHANTHARIKA, M.; WONGSAGONSUP, R.; DANGTIP, S. Characterization of modified tapioca starch in atmospheric argon plasma under diverse humidity by FTIR spectroscopy. **Chinese Physics Letters**, v.30, n.1, 2013.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras**. EdiPUCRS. Porto Alegre, 2007.

GUO, W.; HUO, S.; FENG, J.; LU, X. Adsorption of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on corn straw-derived biochar prepared at different pyrolytic temperatures. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.78, p.265–271, 2017.

HIRANO, S. **Applications of chitin and chitosan in the Ecological and Environmental Fields**. New York, CRC Press, 1997.

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, n.12, p.6017–6084, 2004.

LIU, C. P.; LIU, S. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Microencapsulation**, v.26, n.5, p.377–384, 2009.

- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670–673, 2004.
- MORELLI, F. C.; RUVOLLO FILHO, A. Nanocompósitos de polipropileno e argila organofílica: difração de raio X, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e permeação ao vapor d'água. **Polímeros**, v.20, n. 2, p.121–125, 2010.
- MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*. **Biology Letters**, v.8, p.461-464, 2012.
- PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. **Introduction to Spectroscopy**. Belmont: Cengage Learning, 2009.
- PAULINO, A. T.; SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; NOZAKI, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohidrates Polymers**, v.64, p.98–103, 2006.
- PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v.396, n.1–2, p.153–166, 2003.
- SILVA, G. O.; TAKIZAWA, F. F.; PEDROSO, R. A.; FRANCO, C. M. L.; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; DEMIATE, I. M. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.188–197, 2006.
- SILVA, A. M. Filmes biodegradáveis de amido contendo compostos ativos encapsulados e nanopartículas: uma revisão. 2016.
- TAMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M. R.; BEHLE, R. W.; BEHLE, R. W.; HAMM, J. J.; HAROLD, R.; SUMNER, H. R.; SHASHA, B. S. Sunlight persistence and rainfastness of spray- dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.2, p.210–8, 2000.
- UNEP. Comissão de Revisão dos Poluentes Orgânicos Persistentes. Perfluorooctane sulfona- te: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES OR- GÂNICOS PERSISTENTES, 2016, Rome. UNEP/POPS/POPRC.12/INF/15/Rev.1).
- VAZ, R.; VIEIRA, K. O.; MACHADO, C. E.; FERRARI, J. L.; SCHIAVON, M. E. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. **Química Nova**, v.38, n.10, p.1366–1373, 2015.
- ZHANG, K.; HUANG, J.; YU, G.; ZHANG, Q.; DENG, S.; WANG, B. Destruction of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) by ball milling. **Environmental Science and Technology**, v.47, n.12, p.6471–6477, 2013.
- ZIMMERMANN, M. V. G.; TURELLA, T. C.; ZATTERA, A. J.; SANTANA, R. M. C. Influência do tratamento químico da fibra de bananeira em compósitos de polietileno-co-acetato de vinila com e sem agente de expansão. , v. 24, p. 58–64, 2014.

CAPÍTULO II

*Avaliação do atos comportamentais relacionados à atratividade e incorporação de encapsulados por operárias de *Atta sexdens**

RESUMO

As operárias de formigas-cortadeiras são extremamente seletivas quanto à escolha do material a ser forrageado, e a preferência está relacionada às necessidades nutricionais do fungo, bem como à capacidade de evitar plantas nocivas que possam prejudicar o desenvolvimento do mesmo. Após a seleção, o substrato vegetal é transportado para o interior da colônia para ser processado, e a contaminação com iscas granuladas ocorre de forma semelhante. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atratividade e incorporação de encapsulados à base de quitosana e tapioca em colônias de *Atta sexdens*. Foram utilizadas três colônias com seis repetições para a avaliação dos discos foliares (controle), e três com seis repetições para as observações com os encapsulados. Para analisar o processamento e a incorporação foram realizadas observações sem contagem de tempo dos seguintes atos comportamentais: transporte de disco foliar/encapsulado para a superfície do jardim de fungo; segurar o disco/encapsulado; lambe a superfície; picotar em fragmentos menores; pregar ou prensar os fragmentos; deposição de fluido fecal; incorporação no jardim de fungo; deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados. Os discos foliares apresentaram maior taxa de carregamento em comparação com os encapsulados, evidenciando rejeição pelas operárias. Já nos registros dos atos comportamentais relacionados aos discos foliares, a atividade mais frequentemente observada foi lambe a superfície (21,91%), seguida de segurar o disco (18,13%) e picotar em fragmentos menores (16,4%). Os comportamentos menos observados foram a deposição de fluido fecal (2,7%) e de de hifas sobre os fragmentos incorporados (1%). Nos encapsulados, o ato mais frequente também foi lambe a superfície (21,53%), seguido de segurar (21,41%) e transportar o encapsulado (18,57%). Os atos menos frequentes foram deposição de fluido fecal (1,17%) e de de hifas sobre os fragmentos (0,62%). Os atos comportamentais para o processamento dos substratos foram executados em frequências diferentes, porém de maneira semelhante, dando margem para estudos posteriores de adaptação do encapsulado para o controle de formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: atos comportamentais; encapsulamento; formigas-cortadeiras; processamento de substrato.

*Evaluation of the behavioral acts related to the attractiveness and incorporation of encapsulated by workers of *Atta sexdens**

ABSTRACT

Leaf-cutting ants are considered pests due to the habit of cutting leaves, flowers and tender parts of plants for the cultivation of their mutualistic fungus. The workers are extremely selective about the choice of material to be foraged, and the preference is related to the nutritional needs of the fungus, as well as to the ability to avoid harmful plants that may hinder the development of the fungus. After selection, the vegetable substrate is transported into the colony to be processed, and the contamination with granulated baits occur in a similar manner. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the attractiveness and incorporation of encapsulates based on chitosan and tapioca in colonies of *Atta sexdens*. Three colonies with six replicates were used to evaluate the leaf discs (control), and three with six replicates for the observations with the encapsulates. In order to analyze the processing and the incorporation were realized observations without time counting of the following behavioral acts: transport of leaf disc / encapsulated to the surface of the fungus garden; hold the leaf disc / encapsulated; lick surface, pruning into smaller fragments; crimping the fragments; deposition of fecal fluid; incorporation into the fungus garden; deposition of hyphae on the incorporated fragments. Leaf discs had a higher loading rate in comparison to the encapsulated ones, evidencing rejection by the workers. In the records of behavioral acts related to leaf discs, the most frequently observed activity was licking the surface (21.91%), followed by hold the leaf disc (18.13%) and pruning in smaller fragments (16.4%). The least observed behaviors were deposition of fecal fluid (2.7%) and deposition of hyphae on the incorporated fragments (1%). In the encapsulated, the most frequent act was also to lick (21.53%), followed by hold (21.41%) and transporting the encapsulated (18.57%). The less frequent acts were deposition of fecal fluid (1.17%) and of hyphae on the fragments (0.62%). The behavioral acts for the processing of the substrates were performed at different frequencies, but in a similar way, giving margin for later studies of adaptation of the encapsulated for the control of leaf-cutting ants.

Keywords: behavioral acts; encapsulation; leaf-cutting ants; substrate processing.

1. INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) são insetos-praga da região Neotropical (DELLA LUCIA et al., 1993), devido ao hábito de cortar folhas, flores e partes tenras das plantas para o cultivo do fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* (ESTRADA et al., 2014). O fungo é alimento exclusivo das larvas, e parte do sustento nutricional das operárias, cujo restante é suprido pela seiva que extravasa das folhas no momento do corte (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1976; PAUL; ROCES, 2003).

As operárias são extremamente seletivas quanto ao substrato vegetal fornecido ao fungo, e conseguem detectar odores através das antenas. Outra característica peculiar que auxilia diretamente na seleção dos substratos é a memória olfativa, no qual as forrageiras possuem a capacidade de evitar plantas que não serão benéficas ao cultivo do fungo (ARENAS; ROCES, 2016).

As operárias geralmente optam por folhas novas, com alta umidade, baixa resistência a corte, elevadas taxas de nutrientes, vitaminas e lipídios, que favorecem o desenvolvimento do jardim de fungo (FOWLER; ROBINSON, 1979; ANDRADE et al., 2002). Após a seleção do substrato, iniciam o processamento do material, lambendo a superfície foliar a fim de retirar ceras e possíveis organismos patogênicos ao fungo (ARENAS; ROCES, 2016). Em seguida, mastigam o material a fim de reduzi-lo em fragmentos menores, que serão incorporados como substrato e, por fim, ocorre a deposição de fluido fecal e inoculação do tufo de hifas na superfície dos fragmentos.

Esses atos comportamentais relacionados ao processamento dos substratos são os mais importantes do ponto de vista do controle de formigas-cortadeiras, pois as iscas granuladas, forma mais efetiva de controle, são processadas dentro da colônia de forma similar às folhas. As iscas são compostas por material atrativo, geralmente polpa cítrica, e após o seu carregamento para o interior do ninho, as operárias imediatamente iniciam o ato de lamber os péletes (ANDRADE et al., 2002).

É durante o transporte e processamento de substratos que ocorre a contaminação das operárias por ingestão, uma vez que a polpa cítrica está impregnada com o ingrediente ativo (geralmente sulfluramida) que não apresenta odor ou qualquer outro aspecto de repelência (NICKELE, 2008; ZANETTI et al., 2014; BRITTO et al., 2016).

Em 2009, a sulfluramida foi considerada um poluente ambiental, contudo ao considerar sua viabilidade técnica, atualmente não existem substitutos para a mesma no

Brasil (UNEP, 2016). Neste sentido, foram iniciadas buscas por novos ingredientes ativos ou formas mais eficientes de uso da sulfluramida.

Um das técnicas com potencial viabilidade é o método do encapsulamento, que por meio de esferas envolvidas por biopolímeros, libera o ingrediente ativo de forma gradativa (BRASILEIRO, 2011). Portanto, o objetivo deste capítulo foi verificar a atratividade e incorporação de encapsulados à base de quitosana e tapioca em colônias de *A. sexdens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Criação das colônias de *Atta sexdens*

As rainhas de *Atta sexdens* foram coletadas no município de Araras-SP, após a revoada, que ocorreu no dia 04 de outubro de 2017. As colônias foram mantidas no Laboratório de Biologia de Invertebrados da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12 horas).

Os recipientes plásticos (250 mL) usados para acondicionar as rainhas possuem uma camada de 1,0 cm de gesso para manutenção da umidade. Posteriormente, foram conectados dois recipientes de 250 mL por meio de tubos plásticos, constituindo as câmaras de forrageamento e de lixo (NAGAMOTO et al., 2004). Foram ofertadas folhas de *Ligustrum* sp. como substrato vegetal e, quando as colônias atingiram 500 mL de fungo (11 meses de idade), foram transferidas para caixas de vidro nas dimensões de 10 x 15 x 3,33 cm (largura x comprimento x altura). Cada caixa continha uma camada de gesso no fundo para manutenção da umidade, sendo conectada a uma câmara de lixo e uma de forrageamento (LOPES, 2004) (Figura 1).



Figura 1: Caixa de vidro (câmara de fungo) conectada à câmara de lixo (à esquerda) e de forrageamento (à direita).

2.2. Incorporação de polpa cítrica diretamente no processo

Foi necessária a incorporação de polpa cítrica nos encapsulados à base de quitosana e tapioca para estimular o transporte pelas operárias. Os péletes de polpa cítrica foram doados pela Sucorrício[®], Araras, SP. Foram triturados em moinho (Fritsch[®], modelo Pulverisette 14.702), com diâmetro de peneira de 0,12 µm.

A polpa cítrica foi acrescentada após a inclusão de acetona na solução (Figura 1), na proporção de 1 g pra 10 mL de quitosana, adicionando-se aos poucos até a completa homogeneização. Após o gotejamento em solução de NaOH e formação dos encapsulados, os mesmos foram alocados em placa de Petri aberta e submetidos à secagem (24°C) por dois dias (Figura 2). A temperatura de secagem foi diferente da utilizada para caracterização (50°C), pois em ensaios pilotos as operárias não realizaram o transporte dos encapsulados.

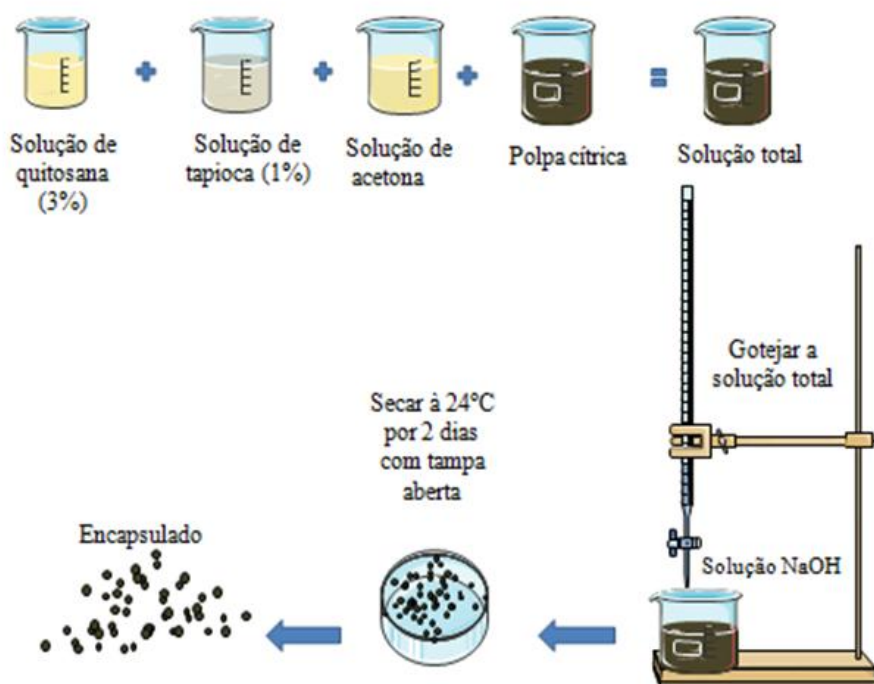


Figura 2: Síntese dos encapsulados e incorporação de polpa cítrica.

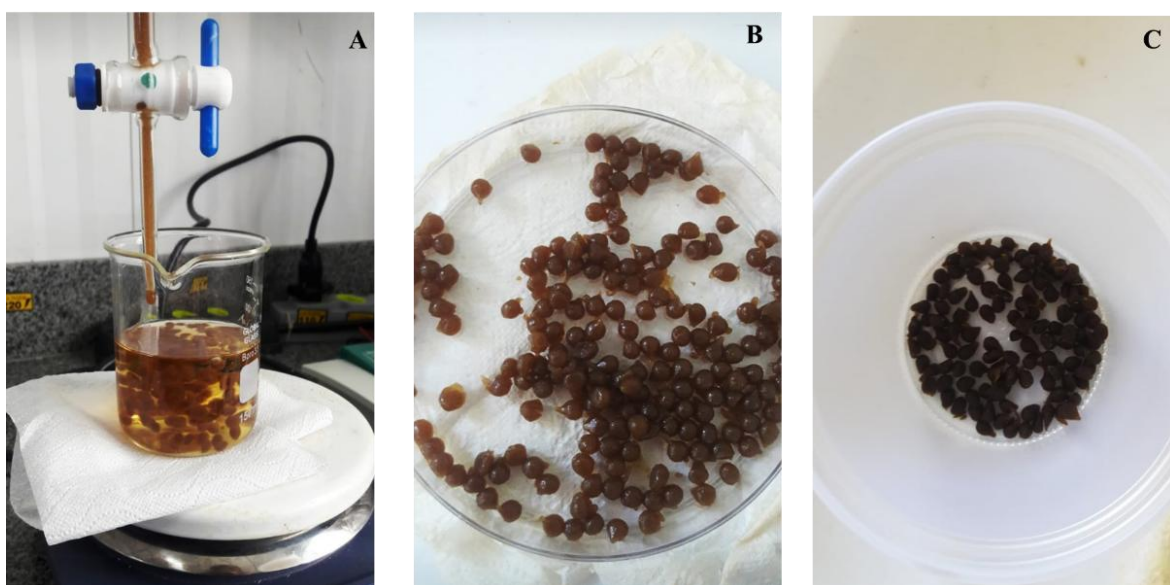


Figura 3: Processo de fabricação de encapsulados á base de quitosana e tapioca: A) Gotejamento na solução de NaOH. B) Secagem a 24°C em placa de Petri. C) Encapsulados secos.

2.3. Atratividade e incorporação em laboratório

Foi avaliada a atratividade e incorporação dos encapsulados produzidos no Capítulo I, contudo sem a incorporação de sulfloramida. Para tanto, discos foliares de 0,7 mm de *Ligustrum* sp. (controle) foram ofertados na câmara de forrageamento de três colônias de *A. sexdens*, e os encapsulados sem ingrediente ativo, na câmara de forrageamento de outras três colônias (ver Figura 1).

Para fins de padronização, verificamos o peso de discos foliares e encapsulados, e ambos apresentaram, em média, 0,01 g cada. Segundo Endringer et al. (2012) a capacidade de carregamento de *A. Robusta* é de aproximadamente 0.0365g e a carga máxima foi de 0,450 g.

Foram ofertados 15 discos foliares ou 15 encapsulados por colônia (adaptado de SILVA et al., 2015), e o tempo de carregamento foi registrado quando o primeiro disco ou encapsulado foi transportado para o jardim de fungo.

Para avaliar o processamento e incorporação foram observados e registrados os atos comportamentais que caracterizam o processamento de substrato pela operárias: transportar o disco/encapsulado para a superfície do jardim de fungo; segurar o disco/encapsulado na superfície do fungo; lambe a superfície e bordas do

disco foliar/encapsulado; picotar o disco foliar/encapsulado em fragmentos menores; preguear as bordas; depositar fluido fecal; incorporar os fragmentos no jardim de fungo; depositar tufo de hifas sobre os fragmentos incorporados.

Devido ao fato de cada ato ser realizado de acordo com o tamanho corporal das operárias, uma amostra com indivíduos de diferentes tamanhos foi retirada para determinação da maior largura da cabeça segundo Wilson (1980): operárias jardineiras = 0,8-1,2 mm, generalistas = 1,3 a 1,6 mm e forrageiras = 1,7-2,2 mm, e esta classificação foi utilizada durante os registros.

As colônias ficaram 24 horas sem alimentação. Todas as observações foram realizadas sem contagem de tempo, ou seja, sem intervalo de tempo para os registros. Foram realizadas sob microscópio estereoscópio com três colônias com seis repetições de 6 h cada, para registrar os comportamentos referentes aos discos foliares, e com seis repetições de 8 h cada, para o registro dos atos relacionados aos encapsulados.

2.4. Análises dos dados

Os principais comportamentos executados pelas operárias de *A. sexdens* na preparação e incorporação dos diferentes substratos no jardim de fungo foram registrados, e a porcentagem de indivíduos que executaram os diferentes atos foram calculados de acordo com a classe de tamanho das operárias (SILVA et al., 2015).

Para a avaliação comparada do tempo de carregamento e dos comportamentos “discos foliares *versus* encapsulados” foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas por meio do software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) e os gráficos feitos com o software Past3 (HAMMER; HARPER, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Tempo de carregamento

O tempo de carregamento foi significativamente diferente entre discos foliares e encapsulados ($Z=5,90$; $p < 0,0001$) (Figura 4). As operárias demoraram, em média, 325,99 segundos para transportar os discos foliares e, 93,87 segundos, para os encapsulados. O carregamento de discos foliares foi completo em todas as colônias,

enquanto os encapsulados à base de quitosana e tapioca foram parcialmente carregados pelas operárias de *Atta sexdens*, evidenciando rejeição.

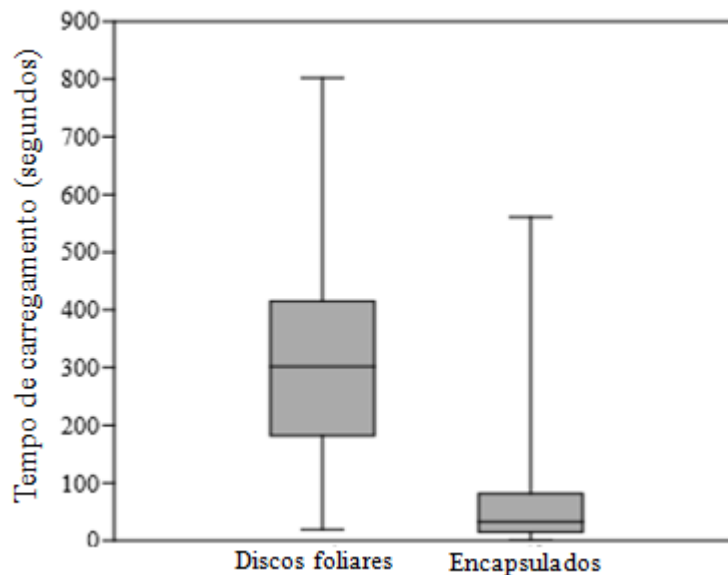


Figura 4: Tempo de carregamento, em segundos, de discos foliares e encapsulados por operárias de *Atta sexdens*. Teste de Mann-Whitney a 5% de significância.

Segundo Femenia et al. (2007), o processo de secagem da polpa cítrica pode interferir em suas propriedades físico-químicas. Como comentado anteriormente, os encapsulados foram secos a 24°C durante dois dias, pois em um ensaio preliminar, com secagem a 50°C, o carregamento foi praticamente nulo.

É possível ainda, que tenha havido interferência dos biopolímeros quitosana e/ou tapioca, bem como de substâncias químicas, como acetona ou NaOH. De acordo com Fowler e Robinson (1979), as operárias possuem a capacidade de evitar substratos devido a mudanças químicas nas folhas. A seleção da planta hospedeira também pode ser influenciada pela experiência prévia das operárias com as plantas (SAVERSCHEK et al., (2010) e, repetidas ofertas de certas espécies, podem levar à rejeição retardada (KNAPP et al., 1990).

Outro fator que pode ter influenciado o carregamentos dos encapsulados é que os insetos sociais desenvolvem mecanismos de defesas, como o allogrooming e o self grooming (HOËLLDOBLER; WILSON, 1990). Esses mecanismos servem para autolimpeza da operárias e eliminação de organismos e substâncias antagonistas a colônia (OKUNO et al., 2011).

A menor taxa de carregamento de encapsulados para o interior da colônia resultou, conseqüentemente, em menor de frequência de atos comportamentais observados quando comparado aos discos foliares. Contudo, não foi observado descarte dos encapsulados carregados na câmara de lixo.

3.2. Processamento e incorporação dos discos foliares

Os atos comportamentais realizados pelas operárias durante o processamento dos discos foliares podem ser observados na Figura 5 e Tabela 1.

Com maior frequência, lambr a superfície e as bordas dos discos foliares correspondeu a 21,91% do total de atos comportamentais executados, sendo realizado principalmente por jardineiras (61,81% do total de operárias). Silva et al. (2015) também observaram que esse foi o ato mais observado (38,88%), e que a maioria das operárias envolvidas foram jardineiras. Esse comportamento é o mais importante durante o processamento das folhas, pois é quando ocorre a limpeza e remoção de microrganismos do substrato vegetal (QUINLAN; CHERRET, 1977; ANDRADE et al., 2002).

O segundo comportamento mais frequente foi o de segurar o disco foliar sobre a superfície do fungo (18,13%), desempenhado por 71,57% das generalistas. O mesmo foi observado por Andrade et al. (2002), onde o ato de segurar o disco correspondeu a 16,4% das atividades, e foi desempenhado principalmente por generalistas (78,34%).

O terceiro ato mais observado foi picotar os discos foliares em fragmentos menores (16,6%) e, na seqüência, transportar os discos foliares (15,55%), realizado por forrageiras (59,83%) e generalistas (36,94%).

A incorporação no jardim de fungo representou 14,77% e foi realizada principalmente por jardineiras (84,76%). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2015), com 12,14% do total correspondendo a este ato. O pregueamento das bordas correspondeu a 12,66% e 68,45% das generalistas. Os comportamentos menos observados foram deposição de fluido fecal (2,7%) e de hifas sobre os fragmentos incorporados (1%).

As operárias mais atuantes no processamento de discos foliares foram as generalistas (47,38%), seguidas por jardineiras (37,38%) e forrageiras (15,27%).

Andrade et al. (2002) observaram que a generalistas foram responsáveis por 40% de todos os atos comportamentais relacionados ao processamento.

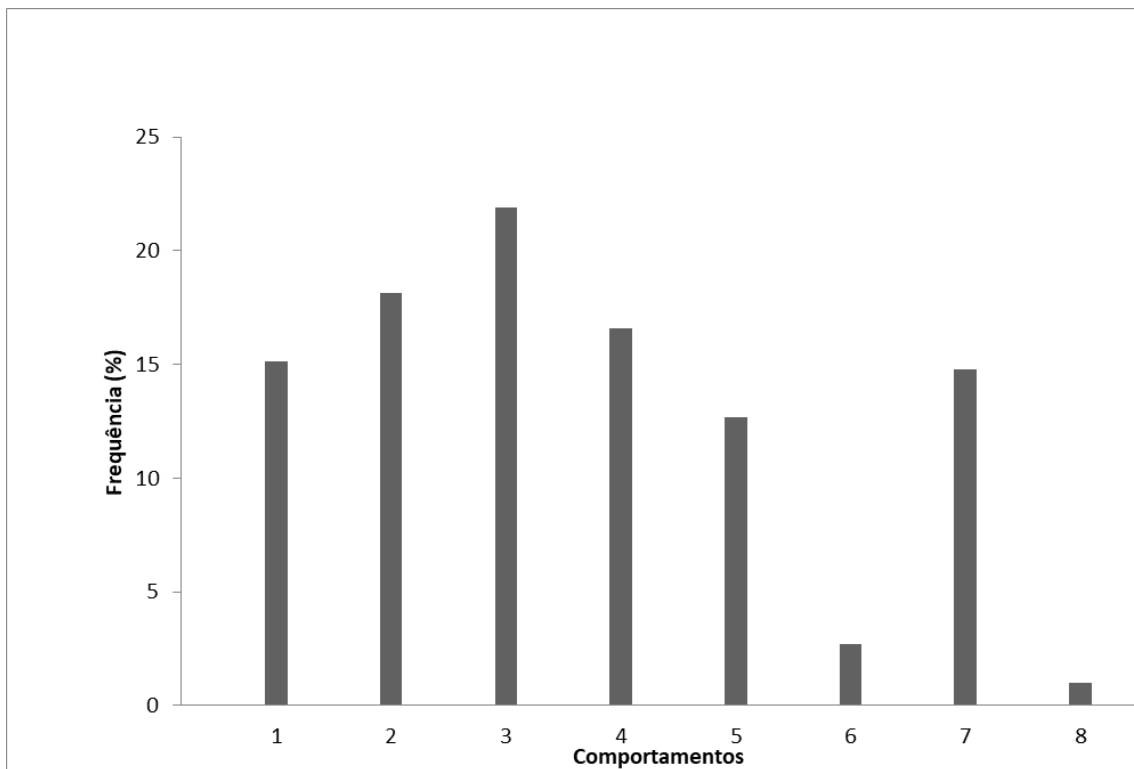


Figura 5: Porcentagem de cada ato comportamental exercido por operárias de *Atta sexdens* na preparação e incorporação no jardim de fungo dos discos foliares. 1: Transportar o disco para a superfície do jardim de fungo; 2: Segurando o disco na superfície da cultura de fungos; 3: Lamber superfície e bordas do disco foliar; 4: Picotar o disco foliar em fragmentos menores; 5: Preguear as bordas; 6: Deposição de fluido fecal; 7: Incorporação no jardim de fungos; 8: Deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados.

Tabela 3: Porcentagem de indivíduos (por casta) que desempenharam comportamentos durante a preparação e incorporação de discos foliares.

Comportamentos	Casta	Frequência observada	% Comportamento
Transportando o disco para a superfície do jardim de fungo	Jardineiras	23	3,23
	Generalistas	263	36,94
	Forageiras	426	59,83
Total		712	100,00
Segurando o disco	Jardineiras	0	14,82
	Generalistas	594	71,57
	Forageiras	107	12,89
	Total	830	100,00
Lambendo a superfície e bordas	Jardineiras	620	61,81
	Generalistas	323	32,20
	Forageiras	60	5,98
Total		1.003	100,00
Picotando os pedaços de folha em fragmentos	Jardineiras	52	9,01
	Generalistas	478	82,84
	Forageiras	47	8,15
Total		577	100,00
Pregueando as bordas	Jardineiras	151	26,03
	Generalistas	397	68,45
	Forageiras	32	5,52
Total		580	100,00
Deposição de fluido fecal	Jardineiras	100	80,65
	Generalistas	21	16,94
	Forageiras	3	2,42
Total		124	100,00
Incorporação no jardim de fungo	Jardineiras	573	84,76
	Generalistas	81	11,98
	Forageiras	22	3,25
Total		676	100,00
Deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados	Jardineiras	67	88,16
	Generalistas	8	10,53
	Forageiras	1	1,32
Total		76	100,00
Total Geral	Jardineiras	1.709	37,38
	Generalistas	2165	47,35
	Forageiras	698	15,27
Total		4.578	100,00

3.2. Processamento e incorporação dos encapsulados

Os atos comportamentais realizados pelas operárias durante o processamento dos encapsulados estão sumarizados na Figura 6 e Tabela 2.

O ato mais frequente foi o de lambar os encapsulados (21,53%), realizado principalmente por jardineiras (70,20%) (Figura 6). Silva et al. (2015), ao avaliarem o processamento de iscas granuladas por operárias de *A. sexdens*, observaram que o ato de lambar foi o mais executado (38,68%), e a casta mais atuante foi a das jardineiras (51,73%).

Diniz e Bueno (2010) estudaram os comportamentos executados por formigas da tribo Attini na preparação de substratos para o cultivo do fungo mutualístico, e observaram que nas espécies *Acromyrmex disciger*, *Apterostigma pilosum*, *Mycetarotes parallelus*, *Myrmicocrypta* sp., *Trachymyrmex fuscus* and *Trachymyrmex* sp. Nov., o comportamento mais observado também foi o de lambar o substrato.

O segundo comportamento mais observado foi o de segurar o encapsulado na superfície do fungo (21,41%), sendo realizada principalmente por generalistas (69,14%) e jardineiras (15,56%). Transportar o encapsulado para a superfície do jardim de fungo correspondeu a 18,57%, e foi desempenhado com maior frequência por forrageiras (43,19%).

A incorporação no jardim de fungo correspondeu a 13,51% dos atos comportamentais, realizadas principalmente pelas jardineiras (78,08%) e forrageiras (17,35%). Fragmentar os encapsulados (13,08%) foi realizado principalmente por jardineiras (71,23%) e generalistas (27,36%). Silva et al. (2015) observaram que 13,01% dos atos comportamentais corresponderam à fragmentação da isca granulada, demonstrando similaridade com os resultados obtidos com os encapsulados. O ato de prensar o fragmento correspondeu a 10,17% das atividades, e foi desempenhado principalmente por jardineiras (78,05%). Os atos comportamentais menos observados foram a deposição de fluido fecal (1,17%) e a incorporação de hifas no substrato (0,62%).

A casta mais atuante nos processos de incorporação de encapsulados foi a das jardineiras (50,59%), seguida pelas generalistas (34,92%) e forrageiras (14,50%) (Tabela 2).

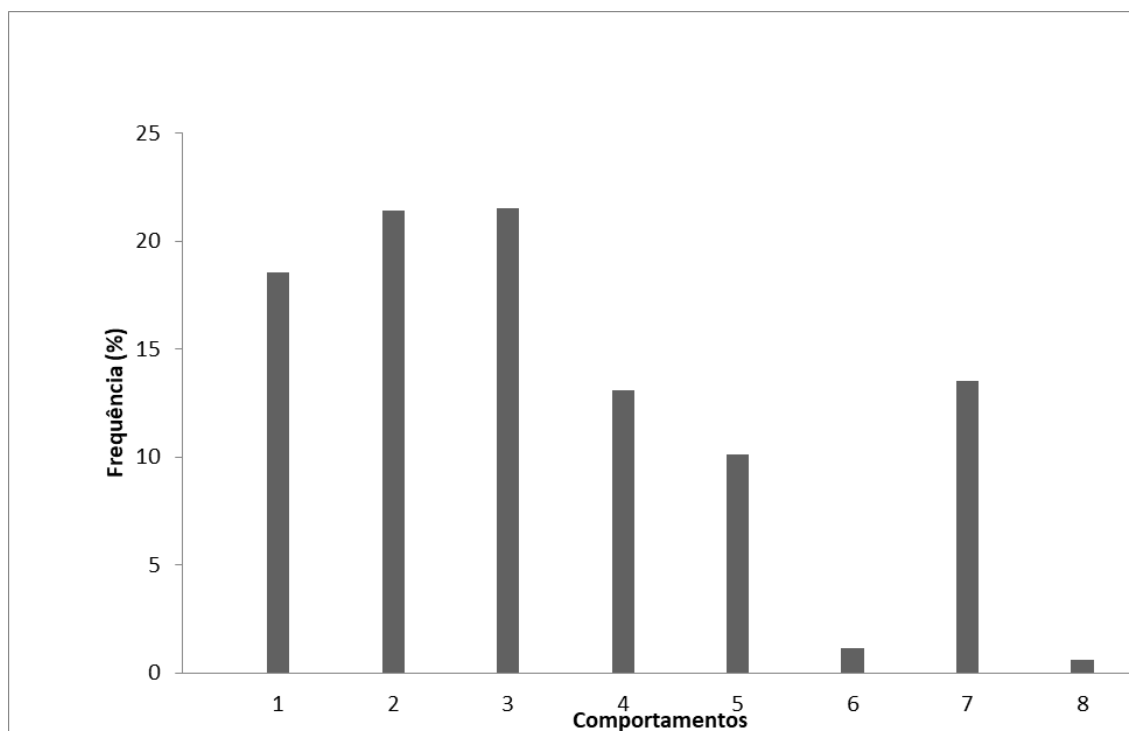


Figura 6: Porcentagem de cada ato comportamental exercido por operárias de *Atta sexdens* na preparação e incorporação no jardim de fungo dos encapsulados. 1: Transportar o encapsulado para a superfície do jardim de fungo; 2: Segurando o encapsulado; 3: Lambendo a superfície; 4: Fragmentação do encapsulado; 5: Prensar o fragmento; 6: Depositar fluido fecal; 7: Incorporação no jardim de fungos; 8: Deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados.

Tabela 4: Porcentagem de indivíduos (por casta) que desempenharam comportamentos durante a preparação e incorporação de encapsulados.

Comportamentos	Casta	Frequência observada	Porcentagem
Transportando o encapsulado para a superfície do jardim de fungo	Jardineiras	47	15,61
	Generalistas	124	41,20
	FORAGEIRAS	130	43,19
Total		301	100,00
Segurando o encapsulado	Jardineiras	54	15,56
	Generalistas	242	69,74
	FORAGEIRAS	51	14,70
Total		347	100,00
Lambendo a superfície e bordas	Jardineiras	245	70,20
	Generalistas	93	26,65
	FORAGEIRAS	11	3,15
Total		349	100,00
Fragmentação dos encapsulados	Jardineiras	151	71,23
	Generalistas	58	27,36
	FORAGEIRAS	3	1,42
Total		212	100,00
Prensar fragmentos	Jardineiras	128	78,05
	Generalistas	35	21,34
	FORAGEIRAS	1	0,61
Total		164	100,00
Deposição de fluido fecal	Jardineiras	14	73,68
	Generalistas	4	21,05
	FORAGEIRAS	1	5,26
Total		19	100,00
Incorporação no jardim de fungo	Jardineiras	171	78,08
	Generalistas	10	4,57
	FORAGEIRAS	38	17,35
Total		219	100,00
Deposição de hifas sobre os fragmentos incorporados	Jardineiras	10	100,00
	Generalistas	0	0,00
	FORAGEIRAS	0	0,00
Total		10	100,00
Total Geral	Jardineiras	820	50,59
	Generalistas	566	34,92
	FORAGEIRAS	235	14,50
Total		1.621	100,00

3.3. Comportamentos comparados: Disco *versus* Encapsulado

Devido à menor taxa de carregamento, todas as atividades executadas pelas operárias durante o processamento dos substratos foram mais frequentes em discos foliares do que em encapsulados, e apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) (Figura 7).

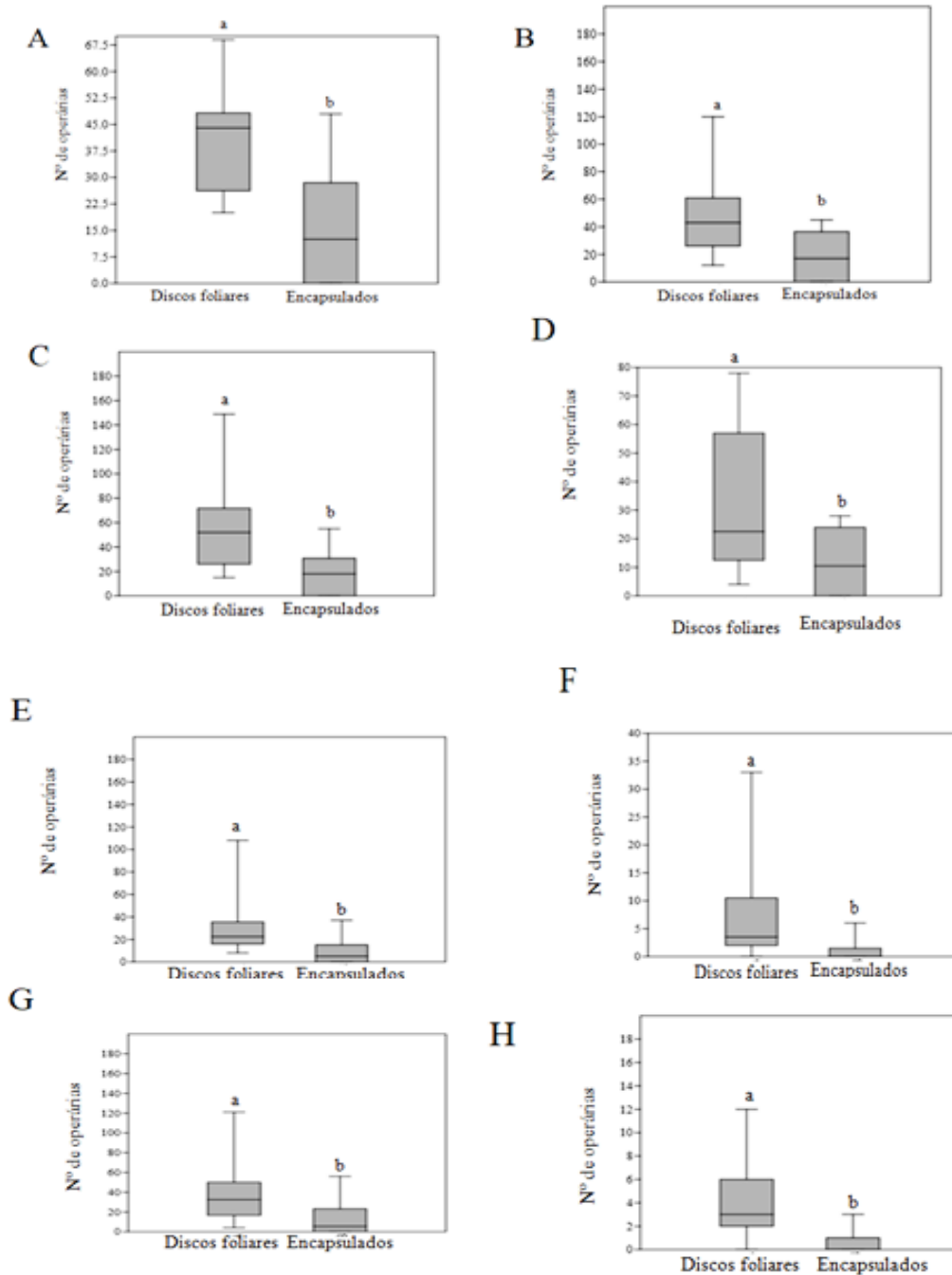


Figura 7: Comportamentos comparados entre discos foliares e encapsulados. A: Transportar; B: Segurar o disco/encapsulado; C: Lamber a superfície; D: Fragmentar; E: Preguear/Prensar o fragmento; F: Depositar fluido fecal; G: Incorporar no jardim de fungos; H: Depositar hifas sobre os fragmentos incorporados.

Contudo, com base no repertório comportamental registrado, pôde-se concluir que os atos comportamentais executados durante o processamento dos discos foliares e encapsulados foi semelhante, assim como observado por Silva et al. (2015) para discos foliares e iscas granuladas.

Ao se comparar o tempo dispendido para a execução dessas atividades, é possível observar que as operárias levaram mais tempo para o processamento dos encapsulados (média de 8 horas) em comparação com os discos foliares (média de 6 horas). O número de operárias envolvidas, bem como fatores físicos inerentes ao substrato podem influenciar neste processo (SILVA et al., 2015).

É de conhecimento que estes fatores físicos podem influenciar na seleção de substratos, pois as formigas-cortadeiras têm a habilidade de identificar compostos químicos que são atrativos ou repelentes nas plantas, como também na pós-seleção durante a incorporação no jardim de fungos (CAMARGO et al., 2004; SAVERSCHEK et al., 2010).

Outro aspecto que pode ter influenciado é o fato das operárias apresentarem memórias a longo prazo (memória olfativa), conseguindo distinguir quais substratos são benéficos e quais comprometem o desenvolvimento do fungo (SAVERSCHEK et al., 2010; ARENAS; ROCES, 2016).

A otimização dos métodos de secagem pode melhorar aspectos como dureza, umidade e evaporação de odores, que têm interferência direta na preferência de seleção pelas operárias.

4. CONCLUSÕES

Houve menor taxa de carregamento de encapsulados pelas operárias de *A. sexdens* em comparação aos discos foliares. Os atos comportamentais para o processamento dos substratos foram executados em frequências diferentes, porém de maneira semelhante, dando margem para estudos posteriores de adaptação do encapsulado para o controle de formigas-cortadeiras.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A.A; BOARETTO, M.A.C.; RAMOS, V.M.; MATOS, C.A.O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Sociobiology*, v.40, n.2, p.293–306, 2002.

ARENAS, A.; ROCES, F. Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. **Animal Behaviour**, v.115, p.167–174, 2016.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 2007. 364 p.

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

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de Compostos Bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. Paraíba, 2011.

BRITTO, J. S. DE; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A. DE; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; CAMARGO, R. 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**, v.3, p.11–92, 2016.

CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C.; MATOS, C. A. O.; LOPES, J. F.; ANDRADE, A. P. P. Physical resistance as a criterion in the selection of foraging material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel 1911 (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v.5, p.329-331, 2004.

CARLOS, A. A.; FORTI, L. C.; CAMARGO, R. S.; MOREIRA, S. M.; VERZA, S. S.; DINIZ, E. A. Attractiveness of different citrus pulps to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.54, n.3, p.799–805, 2009.

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; MOREIRA, D. D. O. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1993. 262 p.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior**, v.23, n.3, p.205–214, 2010.

ENDRINGER, F.B.; VIANA-BAILEZ, A.M.; BAILEZ, O.E.; Marcos da Cunha TEIXEIRA, M.C.; LIMA, V.L.S.; SOUZA, J.H. Load Capacity of Workers of *Atta robusta* During Foraging (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** v. 59, n.3, p.839-849, 2012.

ESTRADA, C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; BAEL, S. A. V. A. N. Fungal endophyte effects on leaf chemistry alter the in vitro growth rates of leaf-cutting ants' fungal. **Fungal Ecology**, v.8, p.37–45, 2014.

- FEMENIA, A.; GARAU, M. C.; SIMAL, S.; ROSSELLO, C. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. **Food chemistry**, v.104, p.1014–1024, 2007.
- FOWLER, H. G.; PAGANI, M. I.; SILVA, O. A.; FORTI, L. C.; SILVA, V. P.; VASCONCELOS, H. L. A pest is a pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v.13, p.671-675, 1989.
- FOWLER, H. G.; ROBINSON, S. W. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. **Ecological Entomology**, v.4, n.3, p.239–247, 1979.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. **Paleontological Data Analysis**. Blackwell. 2006.
- HOËLLDOBLER; WILSON, 1990. The Ants. The Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts. 732 p.
- KNAPP, J. J.; HOWSE, P. E.; KERMARREC, A. Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K. (Eds.). **Applied Myrmecology: a World Perspective**. Boulder, Colorado: Westview Press, 1990. p. 382–409.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v.66, n.2, p.205–217, 1976.
- NAGAMOTO, N.; FORTI, L.; ANDRADE, A.; BOARETTO, M. A. C.; WILCKEN, C. F. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.44, n.2, p.413–430, 2004.
- NICKELE, M. A. **Distribuição espacial, danos e planos de amostragem de *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) em plantios de Pinus taeda L. (Pinaceae)**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- OKUNO, M.; TSUJI, K.; SATO, H; FUJISAKI, K. Plasticity of grooming behavior against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicus*. **Journal of Ethology**, v. 30, n.1, p. 23–27, 2011.
- PAUL, J.; ROCES, F. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. **Journal of Insect Physiology**, v.49, n.4, p.347-357, 2003.
- QUINLAN, R J; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leafcutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, v.4, n.2, p.151–160, 1979.
- ROBINSON, S. W.; CHERRETT, J. M. Laboratory investigations to evaluate the possible use of brood pheromones of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae, Attini) as

a component in an attractive bait. **Bulletin of Entomological Research**, v.63, n.3, p.519–529, 1974.

SAVERSCHEK, N.; HERZ, H.; WAGNER, M.; ROCES, F. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus : learning and long-term memory in leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, v.79, n.3, p.689–698, 2010.

SILVA, L. C.; CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C.; MATOS, C. A. O.; TRAVAGLINI, R. V. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? **Sociobiology**, v. 62, n. 4, p. 484–493, 2015.

UNEP. Comissão de Revisão dos Poluentes Orgânicos Persistentes. Perfluorooctane sulfona- te: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES OR- GÂNICOS PERSISTENTES, 2016, Rome. UNEP/POPS/POPRC.12/INF/15/Rev.1).

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v.5, n.3, p.439–454, 2014.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf cutter ants (Hymenoptera, Formicidae). I: The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.7, p.143-156, 1980.

CAPÍTULO III

*Avaliação da mortalidade de operárias de *Atta sexdens* após a oferta de encapsulados contendo sulfluramida*

RESUMO

As formigas-cortadeiras são importantes pragas agrícolas da região Neotropical. Sua principal forma de controle é o método químico com o uso de iscas granuladas, cujo ingrediente ativo é a sulfluramida. Em 2009, foi classificada pela Convenção de Esolmo como poluente orgânico persistente de categoria B. Porém, é um ingrediente ativo indispensável à agricultura brasileira, sendo assim necessário aperfeiçoar suas formas de utilização. Neste cenário, o método de encapsulamento é extremamente promissor. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar se os encapsulados produzidos à base de quitosana e tapioca com o ingrediente ativo sulfluramida propiciam a intoxicação e mortalidade de operárias de *Atta sexdens*. Cada subcolônia de *A. sexdens* (recipiente plástico de 250 mL) foi constituída por 20 operárias com largura de cápsula cefálica de 2,2 mm. Foram utilizados os seguintes tratamentos: encapsulados sem ingrediente ativo (ESA), encapsulados com sulfluramida a 2% (m/v) (E2%) e isca granulada comercial Mirex[®] (IGC). O delineamento foi inteiramente casualizado, e constituído por 15 repetições (subcolônias) por tratamento. Após a oferta dos tratamentos, foi adicionado em cada subcolônia cerca de 3 cm³ de fungo e 20 operárias mínimas (largura cefálica de 0,8 a 1,2 mm) para a manutenção do mesmo. As avaliações foram realizadas aos 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21 dias após a aplicação e os sintomas de intoxicação e a mortalidade de operárias foram observados diariamente. As médias de mortalidade foram corrigidas pela fórmula de Abbott. Os dados não apresentaram normalidade, sendo utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis em nível de significância de 5%. Em seguida, foi realizado um pós-teste de Student-Newman-Keuls, para verificar possíveis diferenças entre os tratamentos. Em E2%, as operárias apresentaram sintomas desde o primeiro dia e, no segundo dia de avaliação, 65,59% estavam mortas. No 14º dia todas as operárias morreram. No tratamento IGC, assim como em E2%, as operárias apresentaram sintomas de intoxicação desde do primeiro dia e, no 9º dia, 100% das operárias estavam mortas. Ocorreu diferença estatística para o número de operárias mortas entre os tratamentos ($p=0,0000$), e E2% apresentou mortalidade significativamente maior que ESA ($p= 0,0001$). Em comparação ao tratamento IGC, a diferença entre as pseudo-medianas não foi significativa ($p=0,4520$), indicando

similaridade entre o encapsulado contendo sulfluramida a 2% e a isca granulada comercial. Os encapsulados produzidos à base de quitosana e tapioca com o ingrediente ativo sulfluramida propiciaram a intoxicação e mortalidade de operárias de *Atta sexdens*.

Palavras-chave: formigas-cortadeiras; controle químico; encapsulamento; quitosana; tapioca.

*Evaluation of the mortality of workers of *Atta sexdens* after the supply of encapsulates containing sulfluramide*

ABSTRACT

Leaf-cutting ants are important agricultural pests in Neotropical region. Its main form of control is the chemical method with the use of granulated baits, whose main active ingredient is sulfluramide. In 2009, it was classified by the Stockholm Convention as a category B persistent organic pollutant. However, it is an active ingredient indispensable to Brazilian agriculture, so it is necessary to improve its use. In this scenario, the encapsulation method is extremely promising. Therefore, the objective of the present work was to verify if the encapsulates produced with chitosan and tapioca with the active ingredient sulfluramide propitiates intoxication and mortality of *Atta sexdens* workers. Each subcolony of *A. sexdens* (250 mL plastic container) consisted of 20 workers (head width 2.2 mm). The following treatments were used: encapsulated without active ingredient (ESA), encapsulated with 2% sulfluramide (m/v) (E2%) and commercial bait Mirex[®] (IGC). The design was completely randomized and consisted of 15 replicates (subcolonies) per treatment. Após a oferta dos tratamentos, foi adicionado em cada subcolônia cerca de 3 cm³ de fungo e 20 operárias mínimas (largura cefálica de 0,8 a 1,2 mm) para a manutenção do mesmo. After the supply of the treatments, about de 3 cm³ of fungus and 20 minimum workers (head width 0.8 to 1.2 mm) were added to each subcolony for the maintenance of the same. The evaluations were carried out at 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 and 21 days after application, and the symptoms of intoxication and mortality of workers were observed daily. The mortality averages were corrected by the Abbott formula. The data were not normal, and the non-parametric Kruskal-Wallis test was used at a significance level of 5%. Afterwards, a Student-Newman-Keuls post-test was performed to verify possible differences between treatments. In E2%, the workers presented symptoms from the first day, and on the second day of evaluation, 65.59% of the workers were dead. On the 14th day all the workers died. In the treatment IGC, as well as E2%, the workers showed symptoms of intoxication from the first day and, on the 9th day, 100% of the workers were dead. A statistical significant difference was observed for the number of workers dead between treatments ($p=0.0000$), and E2% presented significantly higher mortality than ESA ($p=0.0001$). Compared to the IGC treatment, the difference between the pseudo-medians was not significant ($p=0.4520$), indicating similarity between the encapsulated

containing 2% (m/v) sulfluramide and the granulated bait. The encapsulates produced with chitosan and tapioca with the active ingredient sulfluramida provided the intoxication and mortality of *Atta sexdens* workers.

Keywords: leaf-cutting ants; chemical control; encapsulation; chitosan; tapioca.

1. INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) são importantes pragas agrícolas, pois atacam folhas, flores e tenros das plantas (BRITTO et al., 2016), e as utilizam como substrato para cultivo de seu fungo mutualístico *Leucocoprinus gongylophorus* (ESTRADA et al., 2014).

Os cultivos comerciais que mais sofrem com o ataque desses insetos são a cana-de açúcar, citros, pastagens e reflorestamentos (DELLA LUCIA, 2003). Por exemplo, Reis Filho et al. (2011) estudaram a desfolha causada por formigas-cortadeiras em *Pinus taeda*, e concluíram que mudas com até 100% de desfolha até os 30 dias de idade têm perdas aproximadas de 20% no diâmetro e 13,3% na altura das plantas.

A principal forma de controle de formigas-cortadeiras é o método químico por meio de iscas granuladas contendo sulfluramida como ingrediente ativo. A contaminação das operárias ocorre durante o transporte e processamento das iscas no substrato incorporado ao jardim de fungos (ANDRADE et al., 2002; SILVA et al., 2015). O uso dessa substância é viável tecnicamente, pois confere contaminação via ingestão, mortalidade em baixas concentrações e modo-de-ação lento (BRITTO et al., 2016).

Visando melhorar a eficiência de liberação desse ingrediente ativo, têm-se buscado por técnicas de liberação controlada. Nesse cenário, o método de encapsulamento é extremamente promissor. Esse método produz esferas envolvidas por biopolímeros, que liberam substâncias de interesse de forma gradual (DASH et al., 2011). Dentre suas vantagens, pode reduzir os riscos de contaminação ambiental por pesticidas (MATTOSO et al., 2012).

No presente trabalho, optou-se por utilizar quitosana e tapioca, que devido às suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade com outras substâncias químicas (DASH et al., 2011), possibilitou a produção de um biopolímero para encapsulamento da sulfluramida. Sendo assim, o objetivo desse capítulo foi avaliar se encapsulados produzidos à base de quitosana e tapioca com o ingrediente ativo sulfluramida propiciam a intoxicação e mortalidade de operárias de *Atta sexdens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Criação das colônias de *Atta sexdens*

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia de Invertebrados da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, em incubadora B.O.D. com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 70% de umidade relativa.

Foram utilizadas colônias de *Atta sexdens*, com idade aproximada de 2 anos, contendo 4 L de fungo, conectadas a recipientes plásticos de 250 mL, correspondendo às câmaras de forrageamento e descarte de resíduos. Estas foram mantidas com folhas de *Ligustrum* sp.

2.2. Preparação dos encapsulados controle e com ingrediente ativo

Para preparar os encapsulados controle, contendo quitosana e tapioca e sem ingrediente ativo (ESA), foi utilizado o protocolo para caracterização dos encapsulados apresentado no capítulo 1.

No encapsulado contendo sulfluramida a 2% (m/v) (E2%), foi acrescentado 6 mL da solução de acetona e sulfluramida junto à solução de quitosana e tapioca. O tempo de secagem foi o mesmo para ambos os tratamentos, 24°C por dois dias em placa de Petri aberta.

2.3. Aplicação dos tratamentos

As subcolônias foram retiradas de colônias adultas de *A. sexdens*, com dois anos, e volume de fungo aproximado de 5L. Optou-se por utilizar subcolônias para a aplicação dos tratamentos, visto que o seu uso, ao invés de colônias inteiras, é frequente (HERZ et al., 2008), além de ter a vantagem de padronizar a população (NAGAMOTO et al., 2011).

Cada subcolônia de *A. sexdens* consistiu de um recipiente plástico de 250 mL com 0,8 cm de gesso para manutenção de umidade (NAGAMOTO et al., 2004) e 20 operárias com largura de cápsula cefálica de 2,2 mm (Figura 1).

O gesso foi umedecido com água destilada no dia anterior à inclusão das operárias. Antes de ofertar os tratamentos, foram retiradas duas operárias, incluindo as mortas ou moribundas.



Figura 1: Subcolônias de *Atta sexdens* preparadas para os ensaios e acondicionadas em incubadora B.O.D.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: encapsulado sem ingrediente ativo (ESA), encapsulado com sulfluramida a 2% (m/v) (E2%) e isca granulada comercial Mirex[®] (sulfluramida a 0,3% m/v) (IGC). Foram disponibilizados 2g de encapsulados/iscas em cada subcolônia, por um período de 24 horas (NAGAMOTO et al., 2004).

Após esse período, o material ofertado foi retirado e cada subcolônia recebeu aproximadamente 3 cm³ de fungo, além de 20 operárias mínimas (largura de cápsula cefálica de 0,8 a 1,2 mm), responsáveis pela manutenção do mesmo (BASS; CHERRETT, 1995).

As avaliações foram realizadas aos 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21 dias após a aplicação, sendo realizada a contagem do número de operárias mortas/dia em cada subcolônia (NAGAMOTO et al., 2004). As médias de mortalidade foram corrigidas pela fórmula de Abbott (1925).



Figura 3: Subcolônia contendo 3 cm³ de fungo, 20 operárias com largura de cápsula cefálica de 2,2 mm e 20 operárias mínimas.

Os sintomas de intoxicação foram avaliados de acordo com Nagamoto (2004):

t= tremores;

l= movimentos lentos;

f= dificuldades de movimentar as pernas;

d= pernas dianteiras paralisadas;

p= pernas traseiras paralisadas;

i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gaster com movimentos normais;

g= paralisia geral.

2.4. Análise dos dados

Para a análise dos dados foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de probabilidade de 5%. Em seguida, foi realizado um pós-teste de Student-Newman-Keuls. As análises foram feitas no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na tabela 1 correspondem ao tratamento ESA, considerado como controle, e utilizado para fins de comparação com os demais tratamentos.

Tabela 1: Mortalidade acumulada aos 21 dias de avaliação. Encapsulados sem ingrediente ativo. Sintomas de morbidez em operárias t= tremores; l= movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas; p= pernas traseiras paralisadas; i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gáster com movimentos normais; g= paralisia geral. Porcentagem de mortalidade, corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

Subcolônia	Dias de avaliação									
	1	2	3	5	7	9	11	14	17	21
1	4 2l	10	10 7t	19 1g	20	20	20	20	20	20
2	1	1	1	7 3l	8	8	9	17	19	20
3	0	0	1	11	13	17 3l	17 3l	17	20	20
4	1	1	1	2	6	7	13 li	16	20	20
5	1	1	1	1	2	5	7	7	7	7
6	0	0	2	19 1g	20	20	20	20	20	20
7	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
8	0	0	0	1	1	1	1	3	3	5
9	1	2	2	2	2	3	4	4	4	5
10	2	4	7	15 5i	20	20	20	20	20	20
11	0	0	0	0	0	0	11	20	20	20
12	0	0	1	1	2	2	2	2	2	5
13	0	0	0	0	1	1	3	6	7	7
14	0	0	2	9 11l	13	13	13	15	15	15
15	0	0	2	2	2	2	2	3	5	6
Mortalidade (%)	4	7	16	34	39	42	56	62	64	64

No tratamento E2%, as operárias apresentaram sintomas desde o primeiro dia (Tabela 2). No segundo dia de avaliação, 65,59% estavam mortas. Até o quinto dia, a taxa de mortalidade foi superior a 90% e, no 14º dia todas as operárias morreram

Tabela 2: Mortalidade acumulada aos 21 dias de avaliação. Tratamento E2%. Sintomas de operárias intoxicadas: t= tremores; l= movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas; p= pernas traseiras paralisadas; i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gaster com movimentos normais; g= paralisia geral. Porcentagem de mortalidade, corrigida pela Fórmula de Abbott (1925).

Subcolônia	Dias de avaliação									
	1	2	3	5	7	9	11	14	17	21
1	2 4g 3i	7 12i	11 9i	15 5p	19 1g	19 1g	20	20	20	20
2	12 5p	16 4i	20	20	20	20	20	20	20	20
3	9 8g	17 3i	20	20	20	20	20	20	20	20
4	9 5i 3g	18 2f	20 4i	20	20	20	20	20	20	20
5	9 3i 5g	14 6i	16	18 2g	20	20	20	20	20	20
6	5 15 f	12 8f	20	20	20	20	20	20	20	20
7	7 4g 3p	6 12p	18 2i	18 2g	19 1g	19 1g	20	20	20	20
8	5 15f	16 4g	19 1i	20	20	20	20	20	20	20
9	12 5i3g	18 2g	20	20	20	20	20	20	20	20
10	1 19i	6 8i 3g	20	20	20	20	20	20	20	20
11	2 10l 2p	18 2i	14 6i	17 3p	20	20	20	20	20	20
12	1 19l	9 4p	9 11l	13 7p	16 4p	17 3p	19 10	20	20	20
13	11 2i2p	12 6p	18 2i	18 2g	1i	20	20	20	20	20
14	10 5g 1i	19	19	19 1g	19 1g	20	20	20	20	20
15	1 4p 2i	16 4p	13 7i	19 1i	19 1i	19 1p	19 1p	20	20	20
Mortalidade (%)	32	68	86	92	97	98	99	100	100	100
Mortalidade corrigida (%)	29	65,59	82,94	88,38	95,08	96,57	98,50	100	100	100,00

No tratamento IGC, assim como em E2%, as operárias apresentaram sintomas de intoxicação desde do primeiro dia. No nono dia de avaliação 100% das operárias estavam mortas (Tabela 3).

Tabela 3: Mortalidade acumulada aos 21 dias de avaliação. Tratamento IGC. Sintomas de morbidez em operárias: t= tremores; l= movimentos lentos; f= dificuldades de movimentar as pernas; d= pernas dianteiras paralisadas; p= pernas traseiras paralisadas; i= todas as pernas paralisadas, mas antenas e gaster com movimentos normais; g= paralisia geral. Porcentagem de mortalidade, corrigida pela Fórmula de Abbott (1925).

Subcolônia	Dias de avaliação									
	1	2	3	5	7	9	11	14	17	21
1	7 4f 7i	17 2p 1g	17 3g	20	20	20	20	20	20	20
2	8 6p	17 1p 2g	20	20	20	20	20	20	20	20
3	1 18p 1g	5 15g	14 6g	20	20	20	20	20	20	20
4	3 14p	12 6p	15 5p	20	20	20	20	20	20	20
5	5 9p	10 2p	14 6p	17 3g	20	20	20	20	20	20
6	2 17p	17 3g	20	20	20	20	20	20	20	20
7	19 1i	20	20	20	20	20	20	20	20	20
8	18 1i	20	20	20	20	20	20	20	20	20
9	3 7g 5t	13 6g	20	20	20	20	20	20	20	20
10	3 6p	10 10p	14 6p	17 3g	20	20	20	20	20	20
11	4 10p	12 3p 2g	13 7g	16 4g	16 1i	20	20	20	20	20
12	17 3i	20	20	20	20	20	20	20	20	20
13	2 18p	8 12p	14 6p	17 3g	19 1i	20	20	20	20	20
14	4 15p	15 5g	16 4g	19 1g	20	20	20	20	20	20
15	1 3i 3p	6 14p	10 10p	17 3p	20	20	20	20	20	20
Mortalidade (%)	32	67	82	94	98	0	0	0	0	0
Mortalidade corrigida (%)	30	65	78.97	91	97	0	0	0	0	0

Comparando os tratamentos, no primeiro dia de avaliação ocorreu diferença significativa para o número de operárias mortas entre os tratamentos ($p=0,0000$). O tratamento E2% apresentou mortalidade significativamente maior que ESA ($p=0,0001$). Já quando comparado ao tratamento IGC, a diferença entre as pseudo-mediana não foram significativas ($p=0,4520$), indicando similaridade entre E2% e IGC. Os mesmos resultados foram observados até o último dia de avaliação.

Assim como em Forti et al. (2007), a intoxicação ocorreu nas primeiras 24 horas e, após 48 horas, os tratamentos E2% e IGC já apresentavam mortalidade superior a 50%. Nagatomo et al. (2004) realizou estudos toxicológicos de ingredientes ativos em subcolônias de *A. sexdens*, e observou que aos sete dias de avaliação, as subcolônias tratadas com sulfluramida apresentaram 100% de mortalidade, corroborando com os resultados encontrados por esse estudo.

No nono dia de avaliação, E2% apresentou 96,57% de mortalidade corrigida, e IGC, 100%. No mesmo período, o tratamento ESA apresentou 58% de operárias vivas. O tratamento E2% apresentou taxa de mortalidade de 100% apenas no 14º dia de avaliação, enquanto em IGC já havia chegado aos 100% de mortalidade no nono dia.

4. CONCLUSÕES

Os encapsulados produzidos à base de quitosana e tapioca com o ingrediente ativo sulfluramida propiciaram a intoxicação e mortalidade de operárias de *Atta sexdens*.

5. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 2007. 364 p.

ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, v.40, n.2, p.293–306, 2002.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v.20, n.1, p.1–6, 1995.

BRITTO, J. S. DE; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A. DE; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; CAMARGO, R. 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**, v.3, p.11–92, 2016.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v.36, n.8, p.981–1014, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C. Hormigas de importancia econômica en la región Neotropical. In: FERNANDEZ, F. (Ed.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Colômbia: Instituto Bogotá. 2003. p.337–349.

ESTRADA, C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; BAEL, S. A. V. A. N. Fungal endophyte effects on leaf chemistry alter the in vitro growth rates of leaf-cutting ants' fungal. **Fungal Ecology**, v.8, p.37–45, 2014.

FORTI, L. C.; PRETTO, D. R.; NAGAMOTO, N. S.; PADOVANI, C. R.; CAMARGO, R. S.; ANDRADE, A. P. P. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, p. 1149-1163, 2007.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. **Paleontological Data Analysis**. Blackwell. 2006.

HERZ, H.; HÖLLDOBLER, B.; ROCES, F. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. **Behavioral Ecology**, v.19, n.3, p.575-582, 2008.

MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. O.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus*. **Biology Letters**, v.8., p.461–464, 2012.

MOREIRA, A. A.; FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; BOARETTO, M. A. C.; ANDRADE, A. P. P.; LOPES, J. F. S.; RAMOS, V. M. Nest Architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.2, p.109-116, 2004.

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**, v.44, n.2, p.413-432, 2004.

NAGAMOTO, N. S.; BARBIERI, R. F.; FORTI, L. C.; CARDOSO, S. R. S.; MOREIRA, S. M. M.; LOPES, J. F. S. Attractiveness of copperleaf-based bait to leaf-cutting ants. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.931–934, 2011.

REIS FILHO, W.; SANTOS, F.; STRAPASSON, P.; NICKELE, M. A. Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31.n.65, p.37–42, 2011,

SAVERSCHEK, N.; HERZ, H.; WAGNER, M.; ROCES, F. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus : learning and long-term memory in leaf-cutting ants. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 3, p. 689–698, 2010.

SILVA, L. C.; CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C.; MATOS, C. A. O.; TRAVAGLINI, R. V. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? **Sociobiology**, v.62, n.4, p.484–493, 2015.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O protocolo de síntese de encapsulados à base de quitosana e tapioca foi estabelecido e, segundo as análises de FTIR, DRX e MEV, os encapsulados analisados apresentam sulfloramida nas concentrações/doses analisadas.
- Houve menor taxa de carregamento de encapsulados pelas operárias de *A. sexdens* em comparação aos discos foliares.
- Os atos comportamentais para o processamento dos substratos foram executados pelas operárias de *A. sexdens* em frequências diferentes, porém de maneira semelhante.
- Os encapsulados produzidos à base de quitosana e tapioca com o ingrediente ativo sulfloramida propiciaram a intoxicação e mortalidade de operárias de *Atta sexdens*.