



Universidade Federal do Tocantins

***Campus* Universitário de Gurupi**

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

ALYNNE SILVA SACHET

**O ÓLEO DE NIM AFETA O SISTEMA IMUNE DAS FORMIGAS-
CORTADEIRAS?**

**GURUPI - TO
2015**



Universidade Federal do Tocantins

***Campus* Universitário de Gurupi**

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

ALYNNE SILVA SACHET

O ÓLEO DE NIM AFETA O SISTEMA IMUNE DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza

**GURUPI - TO
2015**



Universidade Federal do Tocantins

Campus Universitário de Gurupi

Programa de Pós Graduação Programa em Produção Vegetal

ATA nº 04/2015

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PRODUÇÃO VEGETAL,
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**

Aos 12 dias do mês de fevereiro do ano de 2015, às 14:00 horas, no(a) Sala 15 do Bloco BALA II, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Orientador Dr. Danival José de Souza do Campus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Dr. Renato de Almeida Sarmiento do Campus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Dr. Gil Rodrigues dos Santos do Campus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Dr. Marçal Pedro Neto pesquisador Bolsista PNPd do Campus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ALYNNE SILVA SACHET, intitulada “O ÓLEO DE NIM AFETA O SISTEMA IMUNE DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS?”. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer FAVORÁVEL à aprovação, habilitando-a ao título de Mestre em Produção Vegetal.

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dr. Danival José de Souza
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Dr. Renato de Almeida Sarmiento
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Marçal Pedro Neto
Universidade Federal do Tocantins

Gurupi, 12 de fevereiro de 2015.

Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

AGRADECIMENTO

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal Universidade Federal do Tocantins (UFT), pela oportunidade para realização do curso de Mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual seria impossível a conclusão do curso;

A todos os membros da banca, Dr. Renato de Almeida Sarmiento e Dr. Marçal Pedro Neto e Dr. Gil Rodrigues dos Santos pela disponibilidade, e por todo conhecimento repassado;

Ao Dr. Danival José de Souza, por sua orientação, disponibilidade em ensinar, e também por sua amizade.

Ao Sr. Carlos Elpídio, Base Fértil Agrícola, por fornecer o óleo de nim utilizado na pesquisa,

As minhas colegas Daniela Gonçalves Da Silva e Mariela Otoni do Nascimento, sem as quais jamais teria conseguido concluir o curso, obrigada por sua amizade, companheirismo, e disposição em ajudar quando se fez necessário.

A amiga de turma Valdirene Coutinho por tornar as horas de estudos mais agradáveis.

A meus pais Marlete de Jesus Batista e José Carlos Batista, por me ensinarem a nunca desistir dos meus objetivos.

Ao meu esposo Messias Soares Veras, pelo incentivo, companheirismo, dedicação.

Ao meu filho Marcio Victor da Silva Leite, que é a razão pela qual busco sempre melhorar como pessoa e evoluir como profissional, sem o qual nada disso teria sentido.

RESUMO

A agricultura é uma das atividades mais importante que exercemos e, no decorrer do tempo vem sofrendo mudanças sustentáveis, aquelas que amenizam os impactos ambientais dessa atividade. As saúvas são os principais insetos-praga dos cultivos florestais, uma vez que causam severos danos às plantas. Essas formigas podem causar a desfolha total, tanto de mudas como de plantas adultas, levando as plantas à morte, o ataque pode variar de acordo com a idade das plantas e os prejuízos causados também. Novos estudos estão sendo realizados para o uso de plantas com propriedades inseticidas no controle de formigas-cortadeiras e a espécie *Azadirachta indica* é uma das espécies mais estudadas da família Meliaceae, sendo que seus efeitos inseticidas foram comprovados em cerca de 400 espécies de insetos. Diversos métodos alternativos no controle de insetos-praga estão sendo avaliados, dentre eles, alguns agentes biológicos como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. O reconhecimento da presença de um organismo invasor é fundamental para o sistema imunológico de qualquer indivíduo por isso após a invasão de algum patógeno, os hemócitos que circulam livremente na hemolinfa migram para o local da infecção, fagocitam e destroem os invasores. Baseando-se nesses princípios da imunologia das formigas-cortadeiras e no fato de que algumas plantas possuem compostos secundários com ação tóxica contra alguns insetos, buscou-se estudar as propriedades do óleo de nim contra formigas-cortadeiras e avaliar a patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* quando aplicado juntamente com óleo de nim. Na metodologia utilizada, foi aplicado de óleo de nim ou 1 µl de óleo de soja, dependendo do tratamento, no dorso mais 1 µl no aparelho bucal de cada formiga operária das espécies *Atta sexdens* e *Atta laevigata*, com exceção do controle onde nada foi aplicado. Em seguida, foram aplicados 2 µl de uma suspensão de *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹. O óleo de nim provocou mortalidade significativa de operárias de *Atta laevigata*. No entanto, a sua associação com um fungo entomopatogênico não influenciou os resultados, pois a mortalidade desse tratamento não diferiu estatisticamente do tratamento realizado apenas com óleo de soja. Em *Atta sexdens* a associação com o fungo foi necessária para que o resultado fosse estatisticamente diferente do grupo controle, isto é, o tratamento com óleo de nim puro mais o fungo apresentou diferença estatística significativa comparado aos demais tratamentos. A substância azadiractina, presente no óleo de nim, deve ser melhor estudada a fim de se verificar seus efeitos imunossupressores em outras espécies de formigas-cortadeiras, sua ação fungicida, bem como sua influência em outros aspectos fisiológicos desses insetos pragas.

Palavras-chave: Azadiractina; *Atta sexdens*; *Atta laevigata*.

ABSTRACT

Agriculture is one of the most important human activities and it has undergone sustainable changes over time. Recently, measures have been taken in order to mitigate the environmental impacts of this activity. Leaf-cutting ants are the main insect pests of forest crops, since they cause severe damage to plants. These ants can cause total defoliation, both in seedlings and in adult plants, causing death of the plants. Damages vary according to the age of the plants. Studies are being conducted to use insecticides derived of plants in leaf-cutting ant's control. *Azadirachta indica* is one of the most studied species of Meliaceae family and its insecticides properties have been demonstrated in about 400 species of insects of different orders. Furthermore, several alternative methods to control insect are being evaluated, including some biological agents such as entomopathogenic fungi. In this sense, *Metarhizium anisopliae* is one of the most promising species. Recognition of the presence of an invading organism is critical to the immune system of any individual. So, after pathogen invasion, hemocytes freely circulating in the hemolymph migrate to the site of infection, phagocyte and destroy invaders. Here, it was applied neem 1 ul of oil or soybean oil, depending on the treatment, on the back and 1µl in the mouthparts of each ant, with the exception of control where nothing was applied. Subsequently, it was prepared a fungal suspension of *Metarhizium anisopliae* at a concentration of 10^7 conidia ml⁻¹, which was applied to the dorsum of each worker (2 µl). Neem oil caused significant mortality of *Atta laevigata* worker; its association with entomopathogenic fungus did not influence the results because the treatments with only oil produced the same results. In *Atta sexdens*, the association of neem oil with *M. anisopliae*, produced significant mortality when compared to other treatments. The effects of neem oil vary according to insect species. Azadirachtin should be further studied in order to verify their immunosuppressive effects in other species of leaf-cutting ants, their fungicidal action and their influence on other physiological processes of these insect pests.

Keywords: Azadiractina; *Atta sexdens*; *Atta laevigata*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	A EFICIÊNCIA DO NIM NO COMBATE A INSETOS	12
1.2	FUNGO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> NO CONTROLE DE FORMIGAS- CORTADEIRAS ...	13
1.3	SISTEMA IMUNE DOS INSETOS	15
2	MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO UTILIZADO	17
2.2	TESTES DE MORTALIDADE	18
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4	CONCLUSÕES	27
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *Atta sexdens* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%.....19

Tabela 2. Comparação dois a dois as curvas de mortalidade de operárias de *Atta laevigata* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%.....21

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Teste de sobrevivência com operarias da espécie *Atta sexdens*. em que (n) óleo de nim puro, (m) óleo de soja puro, (NF) óleo de nim e *M. anisopliae*, (MF) óleo de soja e *M. anisopliae*, (CF) controle onde foi aplicado somente *M. anisopliae* e (C) controle onde nada foi aplicado.....22

Fig. 2 – Teste de sobrevivência com operarias da espécie *Atta laevigata* em que (n) óleo de nim puro, (m) óleo de soja puro, (NF) óleo de nim e *M. anisopliae*, (MF) óleo de soja e *M. anisopliae*, (CF) controle onde foi aplicado somente *M. anisopliae* e (C) controle onde nada foi aplicado.....24

Fig. 3. Concentração de hemócitos por μl de hemolinfa da espécie *Atta sexdens* nos diferentes tratamentos, teste (ANOVA, Valor do teste $F= 0,046$, valor de $P = 0,955$).....26

Fig. 4. Concentração de hemócitos por μl de hemolinfa da espécie *Atta laevigata* nos diferentes tratamentos, teste (ANOVA, Valor do teste $F=0,271$, valor de $P = 0,765$.).....26

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das atividades mais importante que exercemos e, no decorrer do tempo buscamos mudanças em especial e mais recentemente, aquelas que visam produzir de forma sustentável e que amenizem os impactos ambientais dessa atividade. O setor florestal representa um dos setores mais importantes da economia brasileira (SOARES, 2006), pois gera riquezas e é, também, responsável pela geração de milhões de empregos, diretos e indiretos (Juvenal & Mattos, 2002).

O surgimento de insetos-praga tem aumentado em razão da substituição de florestas nativas por florestas cultivadas de eucalipto, pinus e teca, por exemplo, o que provoca a redução da biodiversidade nas áreas reflorestadas.

As saúvas são os principais insetos-praga dos cultivos florestais, uma vez que causam severos danos principalmente na cultura de *Pinus* e *Eucalyptus*, uma vez que atacam constantemente essas plantas, elas provocam danos intensos e prejuízos consideráveis (ANJOS; DELLA LUCIA; MAYHÉ - NUNES, 1998). Assim sendo, precisam ser controladas em todas as fases do desenvolvimento florestal. Além disso, várias culturas de importância agrônômica também são atacadas pelas formigas-cortadeiras: algodão, arroz, milho, soja e trigo, por exemplo.

O ataque pode variar de acordo com a idade das plantas e os prejuízos causados também. Os maiores danos relatados foram em plantas jovens ainda na fase de muda, devido à fragilidade dessas plantas, os danos causados podem ser irreversíveis (ANJOS, DELLA LUCIA; MAYHÉ - NUNES, 1998). Essas formigas podem causar a desfolha total, tanto de mudas como de plantas adultas, levando as plantas à morte (DELLA LUCIA, 1993; HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

As folhas são cortadas, transportadas e inspecionadas no interior do ninho, onde são cortadas em fragmentos menores, raspadas para a retirada de microrganismos. Em seguida, as formigas inoculam hifas nesse material e depositam líquido fecal, o qual é rico em enzimas digestivas. O processo de

digestão e assimilação dos nutrientes está diretamente ligado ao fungo mutualista. As enzimas hidrolíticas produzidas pelo fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* têm papel vital na simbiose. Essas enzimas degradam o material incorporado, de onde o fungo obtém nutrientes para se desenvolver e disponibiliza para as formigas (DELLA LUCIA, 2011).

As colônias iniciais possuem um baixo percentual de sobrevivência, mas quando elas se estabelecem, o fungo simbiote necessita de substrato para o seu cultivo e, por isso, as formigas podem causar grandes prejuízos em função do seu hábito de cortar folhas (BOARETTO; FORTI, 1997).

Para que haja a eliminação total do formigueiro, a rainha deve ser eliminada, além disso, a eliminação das operárias menores, denominadas jardineiras ou babás, constitui uma boa opção. Elas são encarregadas de cuidar dos fungos (hifas) e da trituração final das folhas que servem de substrato para o fungo (PERES FILHO, 2002).

A seletividade no corte das espécies vegetais pode estar relacionada com as exigências nutricionais do fungo simbiote mutualista. A relação mutualística entre as formigas e o fungo é obrigatória, de tal forma que nenhum deles poderia sobreviver isoladamente, pois o fungo que as formigas se alimentam as mantém livre de contaminantes que possam comprometer o seu desenvolvimento, além de lhe fornecer o substrato para seu crescimento (HOLLDÖBLER e WILSON, 1990).

A importância das formigas-cortadeiras nos sistemas florestais levaram algumas empresas a formarem equipes permanentes e exclusivas no combate desses insetos. O combate é realizado quase que exclusivamente, com o uso de inseticidas químicos nos quais estão incluídos piretroides, neonicotinoide, carbamato, Fenilpirazol, e sulfona fluoralfática (Brasil, 2010).

O controle das formigas-cortadeiras é feito principalmente pelo uso de iscas granuladas. Essas iscas compreendem um substrato atrativo (polpa cítrica, por exemplo) em mistura com um princípio ativo sintético, em pellets (Boaretto & Forti, 1997, ZANNETTI 2007). Entretanto, pesquisas têm sido realizadas buscando novas substâncias para o controle dessas formigas que

sejam eficientes e que não provoquem dano ao meio ambiente (OLIVEIRA, 2006).

1.1 A eficiência do nim no combate a insetos

Novos estudos estão sendo realizados para o uso de plantas com propriedades inseticidas no controle de formigas-cortadeiras (SOUZA, 2011, GANDRA, 2011). O nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) também pode ser usado como fertilizante, na indústria de cosméticos, em propriedades rurais pode ser usado na produção de biomassa, em sistemas agroflorestais e também na veterinária. (SOARES, 2006).

Segundo Garcia (2003), o óleo de nim pode causar esterilidade dos insetos, repelência e inanição alimentar. A espécie *A. indica* é uma das espécies mais estudadas da família Meliaceae. Seus efeitos inseticidas foram comprovados em cerca de 400 espécies de insetos (MARTINEZ, 2002). O limonóide denominado azadiractina tem sua atividade comprovada sobre alguns insetos, comparada aos melhores inseticidas sintéticos encontrados no mercado (SCHMUTTERER, 1990).

Mordue e Blackwell (1993) constataram que insetos alimentados ou tratados com azadiractina apresentam morte das larvas durante a ecdise, deformações de pupas e adultos, inibição do crescimento, alongamento da fase larval, redução da fecundidade e fertilidade dos adultos, redução na longevidade e até a morte dos insetos após o tratamento.

A extração de moléculas obtidas de extratos de plantas tóxicas para o manejo de formigas-cortadeiras é uma das áreas mais promissoras. Para isso, é necessário avaliar plantas que possuem resistência ao ataque das formigas-cortadeiras no campo e assim se descobrir princípios ativos que sejam tóxicos às formigas ou ao fungo simbiote (DELLA LUCIA, 2008).

É necessário buscar estratégias de controle alternativo para que se possa reduzir o uso de produtos químicos tradicionais. Alternativas como o controle biológico, mecânico, cultural ou comportamental devem ser exploradas e usadas de forma interligada. Deve-se procurar princípios ativos cujas

formulações e concentrações sejam menos poluentes e mais eficientes no controle de formigas-cortadeiras.

O nim pode ser utilizado para combater várias espécies de pragas. Os seus derivados têm vantagem de ser praticamente não tóxicos ao homem e serem facilmente degradados no solo e nas plantas (ISMAN, 2006). Com relação aos inimigos naturais, os efeitos são variáveis, mas, de maneira geral, eles são menos suscetíveis ao nim do que os insetos fitófagos, (SCHMUTTERER, 1997; AKOL, 2002).

Nesse contexto, uma das alternativas para controle de várias pragas é o uso do nim *Azadiracta indica* (Meliaceae) formulado ou extratos de folhas e sementes. Além de ser considerado um inseticida natural promissor, por provocar baixo impacto ambiental e possuir uma grande amplitude (Leskovar & Boales 1996).

A substância azadiractina tem efeito repelente bem como regulador da alimentação em cerca de 300 espécies de insetos, pertencentes a diferentes ordens: Hemiptera Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Isoptera e Hymenoptera. Sua ação pode ser dar tanto por contato quanto por ingestão (MARTINEZ, 2002). Segundo Schumutterer (1990), o óleo de nim em alguns casos pode ser considerado tão eficiente quanto outros inseticidas sintéticos no controle de insetos. Além de tóxico às formigas, alguns produtos naturais podem ser tóxicos ao fungo simbionte mutualístico *Leucoagaricus gongylophorus*.

1.2 Fungo *Metarhizium anisopliae* no controle de formigas- cortadeiras

Os agrotóxicos causam malefícios ao homem e a outros organismos não alvo. Por isso, diversos métodos alternativos no controle de insetos-praga estão sendo avaliados, dentre eles, alguns agentes biológicos como fungos entomopatogênicos, cujas pesquisas estão sendo intensificadas nas últimas décadas. Entretanto, as formigas-cortadeiras, juntamente com o seu fungo simbionte mutualista, possuem mecanismos de defesa - químicas e/ou mecânicas para dificultar a invasão de inimigos.

Espécies de fungos ascomicetos, como as pertencentes aos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, são entomopatogênicas generalistas, sendo virulentas a diversos insetos, inclusive os sociais. As espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são bastante estudadas como agentes de controle biológico de muitos insetos-praga (HUGHES, 2004). No entanto, apesar de se mostrarem bastante promissoras no controle biológico, há que se ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de virulência desses fungos, bem como os mecanismos de resistência das formigas, de maneira que se possa aumentar o sucesso no uso desses agentes (Boaretto & Forti 1997).

Atualmente, o uso do controle biológico vem assumindo importância crescente dentro de programas de manejo integrado de pragas, num momento em que se discute a produção integrada rumo a uma agricultura sustentável (PARRA 2002). Todavia, a dificuldade de se aplicar o controle biológico microbiano nas formigas-cortadeiras se deve ao fato delas apresentarem um mecanismo de reconhecimento dos microrganismos entomopatogênicos muito eficaz, exibir um comportamento eficiente de defesa da colônia, remover o material contaminante do ninho, inclusive todas as formigas mortas ou doentes (KERMARREC, 1986). Há relatos de colônias de *Acromyrmex* que tiveram contato com esporos do fungo *M. anisopliae* e *B. bassiana* e reagiram, abandonaram os olheiros e abriram outros, reduziram a atividade externa e removeram todo material seco e formigas mortas para fora da colônia (MACHADO, 1988).

As formigas possuem algumas glândulas como as metapleurais que são responsáveis pela produção de substâncias antibióticas, o que auxilia na assepsia da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; POULSEN, 2002; POULSEN 2003; FERNANDEZ-MARÍN, 2006). As saúvas também produzem secreções salivares que podem diminuir a ação de compostos tóxicos como taninos e terpenoides. Elas também podem produzir um líquido fecal que enzimas que, antes de serem inoculadas no fungo, são depositadas no material vegetal. Outro fator que limita a ação de algumas substâncias tóxicas é a associação das cortadeiras com o fungo simbiote, pois o fungo simbiote funciona como um “estômago externo” que tem como função transformar

aleloquímicos vegetais em substâncias palatáveis pelas formiga e também digerir a celulose (MARTIN; WEBER, 1969).

1.3 Sistema imune dos insetos

Por estarem presentes em quase todos os nichos, os insetos estão susceptíveis ao ataque de inúmeros inimigos naturais, muitos dos quais patogênicos. Uma das principais barreiras é a estrutura e a composição química da sua cutícula. Dificilmente bactérias, vírus e protozoários conseguem invadir a hemocele dos insetos via tegumento. Entretanto, se de alguma maneira essa barreira se rompe, bactérias oportunistas que vivem na cutícula conseguem penetrar na hemocele (SILVA, 2002).

A coagulação da hemolinfa permite que o inseto se proteja de patógenos, uma vez que as aberturas do tegumento são fechadas. Algumas proteínas solúveis que interagem diretamente com algumas células especializadas atuam na formação desses coágulos, os quais constroem a barreira final do sistema de defesa dos insetos. O sistema imunológico dos insetos não se recorda de seus encontros, ou seja, não aprendem com suas experiências, as reações que se desencadeiam são as mesmas para qualquer patógeno, não produz linfócitos e não sintetiza anticorpos. (SILVA, 2002).

O reconhecimento da presença de um organismo invasor é fundamental para o sistema imunológico de qualquer indivíduo. Nos insetos, a natureza das moléculas que fazem esse reconhecimento não está definida. As defesas celulares como formação de nódulo, encapsulamento e fagocitose são executadas pelos hemócitos (SILVA, 2002).

Após a invasão de algum patógeno, os hemócitos que circulam livremente na hemolinfa migram para o local da infecção, fagocitam e destroem os invasores (SILVA, 2000; RUSSO, 2001). A nodulação ocorre quando a concentração de patógenos é grande, os hemócitos se juntam e formam os nódulos a fim de imobilizar e removê-los de circulação (SILVA, 2002).

Contra patógenos que não podem ser fagocitados e não podem ser isolados em nódulos, como ovos e larvas de endoparatóides, assim que

depositados na hemocele os insetos se defendem formando cápsulas. O encapsulamento ocorre de acordo com fatores genéticos e fisiológicos, tanto do parasitoide quanto do hospedeiro. Mudanças quantitativas dos hemócitos são os primeiros sinais de parasitismo, a quantidade e o tipo de hemócitos são fundamentais para o sucesso da reação (RUSSO, 2001). Segundo Ajamhassani, (2013) na contagem total de hemócitos (CTH) de larvas de *H. cunea* mostrou aumento no número de hemócitos em vários intervalos após a injeção de *B. bassiana*, *I. farinosae* e pérolas de látex, em comparação aos controles.

Apesar das defesas celulares de alguns hospedeiros, alguns inimigos naturais desenvolveram estratégias evadi-las. Alguns aspectos já são conhecidos, apesar de ainda não se entender esses mecanismos de escape. Um exemplo a ser citado é o caso do fungo *Metarhizium anisopliae* que inibe a atividade de adesão e de fagocitose dos plasmócitos dos insetos infectados liberando uma protease (SILVA, 2002).

Os tipos de hemócitos e suas respostas específicas durante a interação inseto-patógeno são bons indicadores de reações de defesa dos insetos, o número total de hemócitos em circulação no inseto varia de acordo com seu estágio de desenvolvimento e seu estado fisiológico. Estudos sobre a concentração de hemócitos são de extrema importância, pois mostram a interação entre entomopatógenos e reação imunológica, e provam a capacidade de recuperação dos insetos, já que os hemócitos desempenham atividades vitais para o seu sistema imunológico.

Baseando-se nesses princípios da imunologia das formigas-cortadeiras e no fato de que algumas plantas possuem compostos secundários com ação tóxica contra alguns insetos, buscou-se estudar as propriedades existentes no óleo de nim contra formigas-cortadeiras e avaliar a patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e seus efeitos juntamente com óleo de nim.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Ecologia de Ecossistemas da Universidade Federal do Tocantins (UFT), *Campus* Universitário de Gurupi, localizado na região sul do Estado do Tocantins, latitude “11°43’45” Sul e longitude 49°04’07” Oeste.

Foi utilizado um total de 12 colônias, sendo seis da espécie *Atta sexdens* e seis da espécie *Atta laevigata*. Essas colônias foram originadas a partir de rainhas recém-fecundadas, as quais foram coletadas em campo, na época da sua revoada. As colônias utilizadas possuem idades diferentes: as mais velhas possuem cerca de três anos e as mais jovens cerca de um ano. Todas foram mantidas em laboratório na temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro e umidade relativa do ar de $70 \pm 2,5^\circ\text{C}$. As colônias foram alimentadas com folhas manga (*Mangifera indica*), ipê-mirim (*Tecoma stans*) e pétalas de rosa (*Rosa* spp.), farelo de trigo e água diariamente e mantidas confinadas em bandejas plásticas.

2.1 Isolamento e identificação do fungo utilizado

O isolamento do fungo utilizado foi realizado previamente pela aluna de mestrado Aline Silvestre Pereira, que foi a campo coletou as formigas e isolou o fungo através das formigas coletadas. Após a esporulação dos fungos nas formigas-cortadeiras foram feitas as repicagens até a obtenção do isolado puro. A repicagem foi feita em ambiente controlado, utilizando-se capela de fluxo vertical, onde os fungos repicados foram postos em placas de Petri em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar pH = 6,2).

Para o crescimento dos fungos, as placas foram mantidas em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

O processo de identificação do isolado foi realizado em duas etapas, na primeira etapa o fungo foi identificado no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Gurupi, outra parte do fungo foi enviada para identificação no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP - São Paulo, onde foi realizado triagem e identificação do

gêneros e espécie do fungo. A identificação do fungo foi realizada segundo caracteres morfológicos encontrados em tratados taxonômicos clássicos (Domsch et al 1980, Samson et al 2000). Adicionalmente, literaturas específicas foram utilizadas para a identificação do fungo *Metarhizium anisopliae*.

2.2 Testes de Mortalidade

No teste inicial de mortalidade, foram utilizadas cinco colônias de *A. sexdens* e quatro colônias de *A. laevigata*. Foram utilizadas 15 operárias para cada tratamento totalizando 45 formigas de cada colônia. As formigas foram transferidas individualizadas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro., foi aplicado óleo de nim cuja composição azadiractina é de 0,12% p/p, solvente, ou de óleo de soja dependendo do tratamento, 1 µl no dorso e 1 µl no aparelho bucal de cada formiga, com exceção do controle, em que nada foi aplicado. As formigas foram identificadas e supridas com água e mele recenseadas diariamente para verificar a sua morte.

No teste de mortalidade com óleo de nim e o fungo, foram utilizadas 3 colônias de *A. sexdens* e 3 colônias de *A. laevigata*. Foram coletadas 15 formigas para cada tratamento, foi aplicado óleo de nim cuja composição é Azadiractina 0,12% p/p, solvente ou de óleo de soja dependendo do tratamento, 1 µl no dorso e 1µl no aparelho bucal de cada formiga, com exceção do controle onde nada foi aplicado, as formigas foram identificadas e supridas com água e mel, foi preparada a suspensão fúngica, de *Metarhizium anisopliae* e adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada mais espalhante adesivo Tween ®80 (0,1%), A suspensão foi filtrada em gaze esterilizada para obtenção da suspensão padrão. Após diluições seriadas, foi realizada a quantificação da concentração de conídios em câmara de Neubauer. Obteve-se, assim, suspensão na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹, a qual foi aplicada no dorso de cada operaria 2 µl da suspensão fúngica de *M. anisopliae* preparada.

As operárias mortas foram lavadas com soluções seriadas de álcool 70%, hipoclorito de sódio 4% e água destilada auto clavada e posteriormente foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf, estéreis, contendo algodão

umidificado e mantidas em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ de temperatura. Depois de dois dias, verificava-se se elas apresentavam extrusão do patógeno.

2.3 Contagem de Hemócitos

Na contagem de hemócitos foram retiradas 0,5 μl de hemolinfa na região meso-pleural das operárias através de uma incisão feita com auxílio de um e diluída em concentração de 10^1 mL^{-1} de solução anticoagulante cuja formulação da solução anticoagulante, preparada para 10 X, é a seguinte:

0.613 M NaOH,

1.563 M NaCl,

0.163 M EDTA,

0.103 M ácido cítrico .

A contagem foi realizada quantificação na câmara de Neubauer.

Quanto às análises N-óleo de nim puro, M- óleo de soja puro, NF- óleo de nim mais *Metarhizium anisopliae*, MF- óleo de soja puro mais fungo *Metarhizium anisopliae*, CF-controle somente com *Metarhizium anisopliae*, C-controle onde nada foi aplicado.

As médias das quantidades de hemócitos por tratamento foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguidas do teste Tukey, quando cabível. Para determinar o tempo de sobrevivência mediana e as curvas de sobrevivência através do teste não paramétrico Kaplan-Meier, seguido de comparação dois a dois pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (Statsoft, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de sobrevivência com a espécie *Atta sexdens*, os tratamentos com óleo de nim provocaram maior mortalidade quando comparados aos dois controles, (C) controle onde nada foi aplicado, (CF) controle onde foi aplicado somente *M. anisopliae* (Fig. 1 e Tabela 1) teve uma diferença significativa no que diz respeito ao controle, conforme mostra logo abaixo a figura 1.

Observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos que utilizaram óleo de nim puro (N) em comparação com os tratamentos com óleo de soja puro (M), mostrando assim que o óleo de nim não foi eficiente no teste de sobrevivência com as operárias da espécie *A. sexdens*. Já os tratamentos com o óleo de nim e fungo (NF) houve significância quando comparado ao óleo de soja puro (M) e ao óleo de soja com fungo (MF).
 Teste Kaplan-Meier t, $P < 0,001$

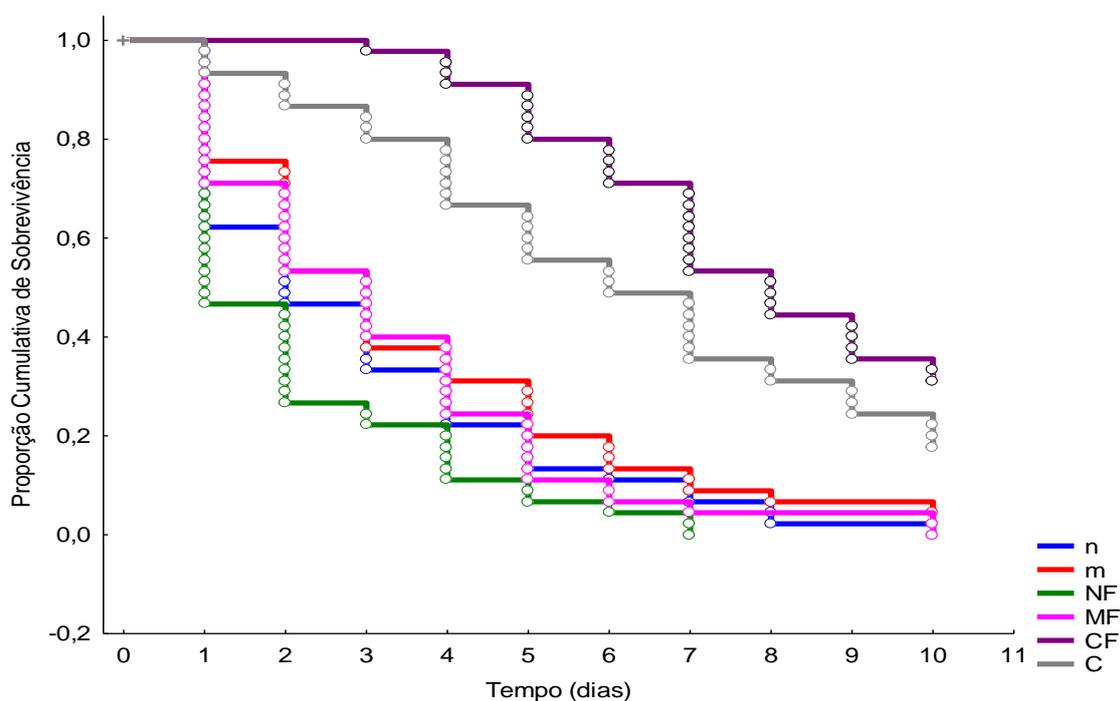


Fig. 1 – Teste de sobrevivência com operárias da espécie *Atta sexdens*. em que (n) óleo de nim puro, (m) óleo de soja puro, (NF) óleo de nim e *M. anisopliae*, (MF) óleo de soja e *M. anisopliae*, (CF) controle onde foi aplicado somente *M. anisopliae* e (C) controle onde nada foi aplicado.

Tabela 1. Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *Atta sexdens* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%.

	M	NF	MF	CF	C
N	0,30	0,06	0,70	$P < 0,001$	$P < 0,001$
M	_____	$P < 0,01$	0,50	$P < 0,001$	$P < 0,001$
NF	_____	_____	$P < 0,01$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
MF	_____	_____	_____	$P < 0,001$	$P < 0,001$
CF	_____	_____	_____	_____	0,35

Segundo Oliveira (2006), o óleo bruto de *A. indica*, quando incorporado em dieta artificial, causou redução na sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, em todas as concentrações testadas. A análise estatística revelou que as concentrações 5 mg/mL, 10 mg/mL e 30 mg/mL apresentaram valores significativos, com mortalidade total no 14° dia para a maior concentração 30 mg/mL e no 25° dia para a concentração 10 mg/mL.

Amaral e Della Lucia (2013) Não verificaram diferenças na taxa de encapsulação das operárias submetidas à dieta a base da folha de Nim, o que também foi observado nos testes à base de soluções sintéticas de azadiractina. Porém, houve um aumento da mortalidade por entomopatógeno após o tratamento com solução de azadiractina.

Júnior (2008) estudou a toxicidade de extratos de nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi*, quanto à sua toxicidade aos fungos entomopatogênicos, verificou-se que as emulsões de nim, nas concentrações de 0,125; 0,25 e 0,5% foram compatíveis com os isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Sendo assim, confirmou-se que, nas referidas concentrações, o produto *Neemseto®* não altera o desenvolvimento dos isolados dos fungos citados, podendo ser utilizado em programas de manejo de pragas.

Carrión (1996) realizaram experimentos, em condições de laboratório, utilizando os fungos entomopatogênicos *Aspergillus parasiticus*, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Atta mexicana* e observaram

alta mortalidade de operárias corroborando com os resultados obtidos neste experimento.

Os resultados encontrados por Marques et al. (2004), com relação a *M. anisopliae*, a partir da concentração 0,039% de óleo de nim ($0,047 \times 10^{-5}$ mL de azadiractina); o óleo de nim não teve efeito sobre o crescimento, indicando que este fungo é menos sensível à ação do óleo de nim, portanto pode perfeitamente ser utilizado em combinação com o óleo, que não afeta seu crescimento.

No teste de sobrevivência com a espécie *Atta laevigata*, os tratamentos com óleo de nim provocaram maior mortalidade quando comparados aos dois controle, (C) controle onde nada foi aplicado, (CF) controle onde foi aplicado somente *M. anisopliae* (Fig. 2 e Tabela 2) teve uma diferença significativa, conforme mostra logo abaixo a figura 2.

Observou-se também diferença estatística significativa entre os tratamentos utilizando óleo de nim (N) em comparação com os tratamentos com óleo de soja puro (M) e óleo de soja e *M. anisopliae*, (MF), mostrando assim que o óleo de nim é eficiente no teste de sobrevivência com as operárias da espécie *A. laevigata*. Teste Kaplan-Meier t, $P < 0,001$

O que mostra que na espécie *Atta laevigata*, o fungo *M. anisopliae*, não teve influência na mortalidade das formigas. Mostrando assim que pode ter causado uma inibição no desenvolvimento do fungo *M. anisopliae*.

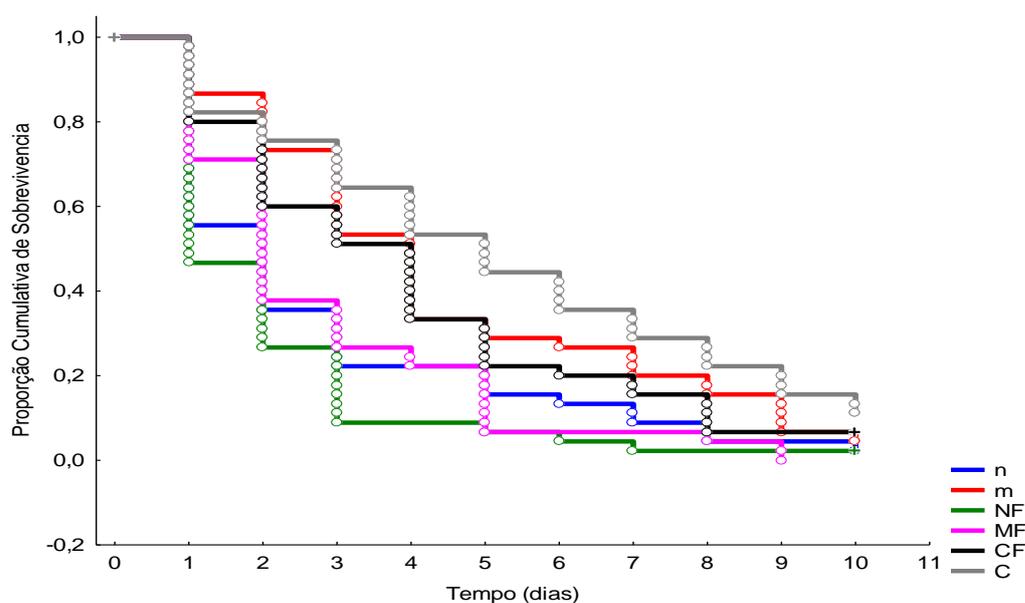


Fig. 2 – Teste de sobrevivência com operárias da espécie *Atta laevigata* em que (n) óleo de nim puro, (m) óleo de soja puro, (NF) óleo de nim e *M. anisopliae*, (MF) óleo de soja e *M. anisopliae*, (CF) controle onde foi aplicado somente *M. anisopliae* e (C) controle onde nada foi aplicado.

Tabela 2. Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *Atta laevigata* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%

	M	NF	MF	CF	C
N	$P < 0,01$	0,20	0,99	$P < 0,01$	$P < 0,001$
M	_____	$P < 0,001$	0,05	0,60	0,18
NF	_____	_____	0,09	$P < 0,001$	$P < 0,001$
MF	_____	_____	_____	$P < 0,01$	$P < 0,001$
CF	_____	_____	_____	_____	0,75

Gonçalves e Bleicher (2006) registraram eficiência de 83,81% no uso de extrato de nim via sistema radicular sobre o pulgão-preto *Aphis craccivora* em plantas de feijão-de-corda. Efeitos negativos do óleo de nim em concentrações de 5% ou maiores, sobre a produção de conídios de *M. anisopliae*, foram

verificados em laboratório por Aguda et al. (1986). Entretanto, estes autores enfatizaram que devem ser consideradas as concentrações em que o óleo de nim é aplicado em casa telada ou campo variando de 0,5 a 2%.

Depieri et al. (2005) avaliando uma formulação comercial de óleo emulsionável de nim (0,5; 1 e 1,5%), do extrato aquoso de sementes (1; 2 e 4%) e do extrato aquoso de folhas de nim (0,15; 1,5 e 15%) com o fungo *B. bassiana*, encontraram que os extratos de sementes e de folhas mostraram-se menos prejudiciais a *B. bassiana* que o óleo emulsionável. Esse produto, nas concentrações testadas, não foi compatível com *B. bassiana*, inibindo, significativamente, o crescimento vegetativo e reduzindo a produção e a viabilidade dos conídios com efeitos mais acentuados nas concentrações mais altas.

Não houve diferença estatística onde o valor de foi $P= 0,955$ nas concentrações de hemócitos da hemolinfa retirada da espécie *A. sexdens* entre os tratamentos avaliados, constando assim que nenhum do óleos aplicados afetou o sistema imune das operarias estudadas.

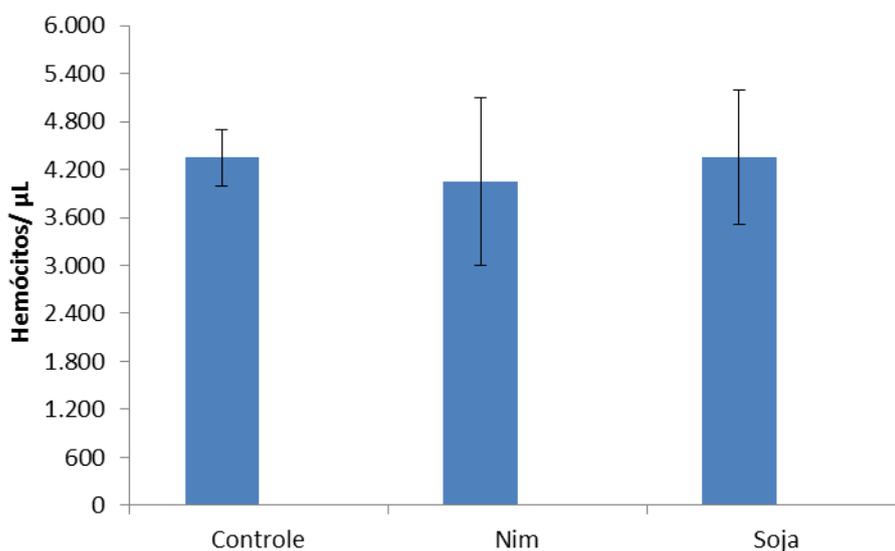


Fig. 3. Concentração de hemócitos por µL de hemolinfa da espécie *Atta sexdens* nos

Diferentes tratamentos, teste diferentes tratamentos, teste (ANOVA, Valor do teste $F= 0,046$, valor de $P= 0,955$).

Na concentração de hemócitos retirada da espécie *A. laevigata*, não houve diferença entre nenhum dos tratamentos avaliados onde o valor de $P= 0,765$, constando assim que nenhum dos óleos aplicados teve efeito imunossupressor nas operárias estudadas.

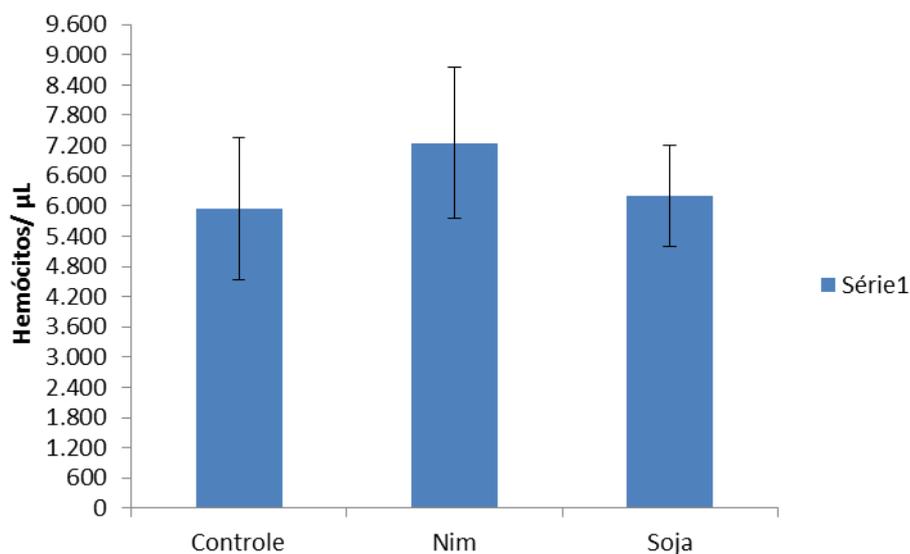


Fig. 4. Concentração de hemócitos por μL de hemolinfa da espécie *Atta laevigata* nos diferentes

tratamentos, teste (ANOVA, Valor do teste $F=0,271$, valor de $P= 0,765$.)

Com relação a porcentagem de formigas que após a tríplice lavagem apresentaram hifas do fungo entomopatogênico aplicado, constatou-se que na espécie *A. sexdens* 64% das operárias onde o óleo de nim e o fungo *M. anisopliae* apresentaram extrusão. As operárias onde o óleo de soja e o fungo foi aplicado 40% apresentaram hifas do patógeno e no controle onde somente o fungo foi aplicado somente 35% das formigas apresentaram hifas. Sugerindo assim que o óleo de nim aplicado não impediu o crescimento do fungo nessa espécie.

Na espécie *A. laevigata* 53% das operárias onde o óleo de nim e o fungo *M. anisopliae* foi aplicado apresentaram extrusão do fungo entomopatogênico. As operárias onde o óleo de soja e o fungo foram aplicados 46% apresentaram hifas do fungo e no controle onde somente o fungo foi aplicado somente 31%

apresentaram extrusão do patógeno. O nim também não impediu o desenvolvimento do fungo na espécie *A. laevigata*.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que o óleo de nim provocou mortalidade das operárias de *Atta laevigata*, e que a associação com o fungo entomopatogênico não influenciou os resultados, pois nos tratamentos onde somente o óleo foi aplicado obteve-se estatisticamente mesmo resultado. Na espécie *Atta sexdens* a associação com o fungo foi necessária para que o resultado fosse satisfatório, pois os tratamentos com óleo de nim puro e fungo apresentou uma diferença estatística significativa comparado aos demais tratamentos.

Na contagem de hemócitos não houve diferenças significativas em ambas as espécies estudadas bem como em todos os tratamentos avaliados.

A substância azadiractina deve ser melhor estudada a fim de se verificar seus efeitos imunossupressores em outras espécies de formigas-cortadeiras, sua ação fungicida, bem como sua influência em outros aspectos fisiológicos desses insetos pragas. Somente deste modo, novas moléculas poderão ser usadas em dosagem e metodologia de aplicação adequada com menor prejuízo ao meio ambiente e com maior êxito no controle dessa praga tão importante.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAMHASSANI, M.; SENDI, J.J.; ZIBAE, A.; Immunological responses of *hyphantria cunea* (drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.-Cry) and *Isaria farinosae* (Holmsk) Fr. Journal of Plant Protection Research 53 (2), 2013

AMARAL, K.D.; DELLA LUCIA, T.M.C. Efeito da azadiractina na imunocompetência de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Resumo oral, UFV, CNPq, Departamento de Biologia Animal. <https://www3.dti.ufv.br/sia/vicosa/2013/trabalhos/410> acesso dia 02 de Fev 2015 às 16 hrs.

ANJOS, N.; DELLA LÚCIA, T. M. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J. Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos. Ponte Nova/ MG: Editora Graff Cor, p. 100, 1998.

AKOL, A.M., S. Sithanatham, P.G.N. Njagi, A. Varela & J.M. Mueke. 2002. Relative safety of sprays of two neem insecticides to *Diadegma mollipla* (Holmgren), a parasitoid of the diamondback moth: effects on adult longevity and foraging behavior. Crop Prot. 21: 853-859

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em <https://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>

BOARETTO, M.A.C; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica IPEF, São Paulo, v.11, n.30, p. 1-46, 1997..

CARRIÓN, G.; QUIROZ, L.; VALENZUELA, J. Hongos entomopatógenos de las hormigas arrieras *Atta mexicana* en México. Revista Mexicana de Micología, México, v.12, p.41-48, 1996

DELLA-LUCIA, T.M.C.; ARAÚJO, M.S. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: DELLA-LUCIA, T.M.C. (Ed.). As formigas cortadeiras. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p.60 – 73.

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R. Perspectiva no manejo de formigas-cortadeiras. In: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. O.; LINO-NETO, J. (Ed.). Insetos sociais: da biologia a aplicação. UFV, Viçosa-MG, 2008. v.1. p.371-380, 441p

DELLA LUCIA, T. M. C.; Formigas Cortadeira, da Biologia ao Manejo. UFV, Viçosa-MG, 2011. v.1 p 205-225.

DEPIERI, R.A; MARTINEZ, S.S; MENEZES JR, A.O. Compatibility of the Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. *Neotropical Entomology*. July-August 2005.

FERNANDEZ-MARÍN,H.; J.K. ZIMMERMAN; S.A. REHNER & W.T. Wcislo 2005. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc. R. Soc. B*. 273: 1689-1695.

GARCIA, F. Produtos naturais como inseticidas e repelentes de insetos. In: JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS, 4, 2003, Itajaí, Anais... Itajaí: Associação Catarinense de plantas Medicinais. p. 35 - 36, 2003.

GONÇALVES, M.E.C.; BLEICHER E. Atividade sistêmica de azadiractina e extratos aquosos de sementes de nim sobre o pulgão-preto em feijão-de-corda. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. *Revista Ciência Agronômica*, v.37, n.2, p.177-181, 2006

HÖLLDOBLER B.; WILSON, E.O. The ants. Cambridge, Massachuset: Springer- Verlag, 1990.732

HÖLLDOBLER, B.& WILSON, E. O. The superorganism: the beauty, elegance, and strageness of insect societies. W. W. Norton, London, 2009, 544 p.

HUGHES, W. O. H. et al. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nest in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 85, p. 46-53, 2004b.

ISMAN, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.

JUNIOR, J.M.A, Seleção De Fungos Entomopatogênicos Associados ao óleo de Nim Para o Controle do Pulgão *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EM COUVE. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Recife - PE Fevereiro – 2008

KERMARREC, A.; FEBVAY, G.; DECHARME, M. Protection of leaf-cutting ants biohazards is there a future for microbiological control? In: Fire ants and leaf-cutting ants biology and management. Boulder: Westview Press, 1986. p. 339-356.

KOUL, O. Neem: a global perspective. In. KOUL, O.; WAHAB, S. Neem: Today and in the New Millennium. Dordrecht: Kluwer, 2004. p.1-19.

MACHADO, V. et al. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera-Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogênicos. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 40, n. 11, p. 1106-1108, 1988.

MARQUES,R.P, Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.6, p.1675-1680, nov-dez, 2004;

MORDUE, A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology, Oxford, v.39, p.903-924, 1993

MARTINEZ, S. S. O nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplo, produção. Paraná, Instituto Agrônômico do Paraná IAPAR, 2002. 142p.

OLIVEIRA, M.F.S.S. CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) COM PRODUTOS NATURAIS. Rio Claro – SP Março / 2006.

PARRA, J.R.P., P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira, J.M.S. Bento. 2002. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Ed. Manole, 635p.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) a diferentes espécies florestais, em condições de laboratório. Ciência Florestal, Santa Maria, v.12, n.2, p.1-7, 2002.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; NIELSEN, M. G.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, New York, v. 52, n. 2, p. 151-157, 2002.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. The effect of metapleural gland on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leafcutting ants. *Naturwissenschaften*, New York, v. 90, n. 9, p. 406-409, 2003.

RUSSO, J.; Brehélin, M.; Carton, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi* *Journal of Insect Physiology* 47: 167-172, 2001.

SILVA, C.C.A. 2002. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 24: 68-72.

SILVA, C.; Gary, B. D.; Rau, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental and Comparative I*

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, P.D.O.; SILVA, D.R.G. Cultivo e usos do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Boletim Agropecuário*, v.68, p.1-14, 2006.

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

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*. v.35, p.271-297, 1990

SCHMUTTERER, H. 1997. Side effects of neem (*Azadirachata indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. *J. Appl. Entomol.* 121: 121-128

ZANETTI, R. (2007) Manejo Integrado de Formigas Cortadeiras e Cupins em Áreas de Eucalipto da CENIBRA. *Laudo Técnico FSC-CENIBRA*, 74 p