



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA

AÇÃO TÓXICA DE OXIMATRINE, TIMOL E ROTENONA ÀS OPERÁRIAS
DE *Atta* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E AO SEU FUNGO
SIMBIONTE

TALYTHA RAVENNA DE MELO SOUZA

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA - BRASIL
2025

TALYTHA RAVENNA DE MELO SOUZA

**AÇÃO TÓXICA DE OXIMATRINE, TIMOL E ROTENONA ÀS OPERÁRIAS
DE *Atta* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E AO SEU FUNGO
SIMBIONTE**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora: Prof. Dra. Aldenise Alves Moreira

**VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA - BRASIL
2025**

S719a

Souza, Talytha Ravenna de Melo.

Ação tóxica de oximatrine, timol e rotenona às operárias de *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) e ao seu fungo simbionte / Talytha Ravenna de Melo Souza, 2025.

60f.

Orientador (a): Dr.^a Aldenise Alves Moreira.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia. Vitória da Conquista, 2025.

Inclui referências

1. *Atta*. 2. *Leucoagaricus gongylophorus*. 3. Rotenona. 4. Timol. 5. Oximatrine. I. Moreira, Aldenise Alves. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. T.

CDD 595.796

Catálogo na fonte: Karolyne Alcântara Profeta – CRB 5/2134

UESB - Campus Vitória da Conquista – BA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Área de Concentração em Fitotecnia**

Campus de Vitória da Conquista, BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: AÇÃO TÓXICA DE OXIMATRINE, TIMOL E ROTENONA ÀS
OPERÁRIAS DE *Atta* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E AO SEU
FUNGO SIMBIONTE.**

AUTOR (A): Talytha Ravenna de Melo Souza

**Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM
AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela seguinte
Banca Examinadora:**

Aldenise Alves Moreira, D.Sc. (UESB)

Roberto da Silva Camargo, D.Sc. (UNESP/Botucatu)

Maria Aparecida Castellani, D.Sc. (UESB)

Carlos Alberto Oliveira de Matos, D.Sc. (UNESP/Itapeva)

Luiz Carlos Forti, D.Sc. (UNESP/Botucatu)

Data de realização: 03 de julho de 2025.

Estrada do Bem Querer, Km 4, CEP 45031-900, Caixa Postal 95, Vitória da Conquista, Bahia,
Brasil Telefone: (77) 3425-9383, e- mail: ppgagronomia@uesb.edu.br

Dedico a Deus a minha perseverança em meio aos desafios e à minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor e apoio incondicional. Juntos enfrentamos as dificuldades e celebramos as vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e por ter me dado sabedoria e discernimento durante toda a minha vida acadêmica e por estar me proporcionando este momento muito especial.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista, pela oportunidade de desenvolver as minhas pesquisas e por ter sido, além de fornecedora de conhecimento, uma família que me acolheu de braços abertos. Agradeço, em especial, ao Laboratório de Entomologia e ao Laboratório de Mirmecologia da UESB em Vitória da Conquista, Bahia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, que financiou a bolsa de estudo para o desenvolvimento da pesquisa.

À minha orientadora Aldenise Alves Moreira, que foi de suma importância no meu aprendizado, pela paciência, pela dedicação, por acreditar no meu potencial e por todo o acolhimento, sendo primordial para tornar esse momento possível.

Aos meus pais, por serem minha base, sempre acreditando, incentivando e me apoiando. Às minhas irmãs, pelos momentos vividos e por serem minhas incentivadoras. Ao meu companheiro Pablo Moreira Freitas, por todo o apoio e por todo incentivo.

Aos colaboradores da pesquisa Maria Aparecida Castellani, Luiz Carlos Forti, Roberto da Silva Camargo, Carlos Alberto Oliveira de Matos, Ellen Rainha da Silva e Óscar Nipato Baptista.

Aos meus amigos, que foram de grande valia nesse momento, o grande sentimento que tenho por todos é como um suporte que me ajudou a chegar até aqui, em especial, Thamires Francisca, Micaela Matos, Ellen Silva, Mateus Santos, Ana Plácido, Jaslem Silva, Benicio Neto, Rayka Kristian, Ana Carolina Melgaço e Bianca Santos, que estiveram comigo durante todo esse processo. Aos meus colegas de mestrado que foram como uma família, passamos momentos bons e ruins juntos, mas que serviram de aprendizado e grande valia.

Todos são especiais e queridos e só tenho a desejar-lhes sucesso. E àqueles que não foram mencionados, mas que, de alguma forma, fizeram parte desta conquista. Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

SOUZA, T. R. M. **Ação tóxica de oximatrine, timol e rotenona às operárias de *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) e ao seu fungo simbiote.** Vitória da Conquista - BA, UESB, 2025. 60 p. (Tese: Doutorado em Agronomia; Área de Concentração: Fitotecnia)*

As formigas cortadeiras são consideradas pragas de grande importância econômica no Brasil, pois causam danos diretos e indiretos aos cultivos agrícolas, florestas e pastagens, gerando perdas na produção e dificultando o estabelecimento de mudas no campo. Diante disso, exige a adoção de estratégias de controle que causem baixo impacto ao homem e ao meio ambiente. Nesse sentido, foram realizados três bioensaios com os objetivos de avaliar a atividade inseticida dos ingredientes ativos rotenona e oximatrine em operárias de *Atta laevigata* e *Atta sexdens*, respectivamente; e do ingrediente ativo timol em operárias de *A. laevigata* e no fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Os bioensaios foram realizados no laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil, em delineamento inteiramente casualizado, com seus respectivos tratamentos e repetições. As avaliações ocorreram no período de 21 dias, quando se estudou a ação inseticida dos ingredientes ativos por ingestão às operárias; e de cinco dias para a avaliação do efeito fungicida. Os resultados obtidos revelaram que a rotenona, oximatrine e timol possuem ação inseticida às formigas *A. sexdens* e *A. laevigata*, por ingestão, indicando que esses compostos apresentam potencial para utilização na formulação de isca tóxica, para o controle de formigas cortadeiras. No entanto, o ingrediente ativo timol, nas concentrações estudadas, não apresentou efeito fungicida no fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Palavras-chave: *Atta*; *Leucoagaricus gongylophorus*; rotenona; timol; oximatrine

*Orientadora: Prof. Dra. Aldenise Alves Moreira, UESB.

ABSTRACT

SOUZA, T. R. M. **Toxic action of oxymatrine, thymol and rotenone on workers of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) and their symbiotic fungus.** Vitória da Conquista - BA, UESB, 2025. 60 p. (Thesis: Doctorate in Agronomy; Area of Concentration: Crop Science)*

Leaf-cutter ants are considered of great economic importance in Brazil, as they cause direct and indirect damage to agricultural crops, forests, and pastures, leading to production losses and hindering seedling establishment in the field. Therefore, it is necessary to adopt control strategies that cause low impact to humans and the environment. In this context, three bioassays were conducted to evaluate the insecticidal activity of the active ingredients rotenone and oxymatrine on *Atta laevigata* and *Atta sexdens* workers, respectively, and of the active ingredient thymol on *A. laevigata* workers and the fungal symbiont *Leucoagaricus gongylophorus*. The bioassays were conducted at the Myrmecology Laboratory of the Southwest Bahia State University (UESB), Vitória da Conquista, Bahia, Brazil, in a highly randomized design, with their respective treatments and replicates. The evaluations were conducted over a 21-day period, during which the insecticidal action of the active ingredients was assessed by ingestion of workers, and over a five-day period to evaluate their fungicidal effect. The results revealed that rotenone, oxymatrine, and thymol have insecticidal action on *A. sexdens* and *A. laevigata* ants, demonstrating that these compounds have potential for use in toxic bait formulations for controlling leaf-cutting ants. However, the active ingredient thymol, at specific concentrations, had neither fungicidal effects in the symbiotic fungus *L. gongylophorus*.

Keywords: *Atta*; *Leucoagaricus gongylophorus*; rotenone; thymol; oximatrine

*Advisor: Prof. Dra. Aldenise Alves Moreira, UESB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Isca de polpa cítrica adicionada de sacarose 10% (A) e detalhe da placa de Petri com operárias de *Atta sexdens* e isca com oximatrine (B).....27
- Figura 1.2 - Curvas de probabilidade de sobrevivência para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em diferentes tratamentos.....28
- Figura 2.1 - Dieta confeccionada com polpa cítrica (A), oferta das iscas com os tratamentos às operárias de *Atta laevigata* (B) e colocação da esponja fúngica após a oferta dos tratamentos (C).....36
- Figura 2.2 - Detalhe da esponja fúngica, com jardineiras e cortadeiras de *Atta laevigata*, utilizada no bioensaio com *Leucoagaricus gongylophorus* (A) e folhas de *Acalipha* sp. utilizadas para a manutenção do fungo simbiote (B).....38
- Figura 2.3 - Detalhe do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, nos diferentes estágios de degradação, de acordo com as notas: 0% - normal, 10% - Pouco degradado, 50% - medianamente degradado, 80% - altamente degradado e 100% - totalmente degradado.....39
- Figura 2.4 - Detalhes dos cortes de folhas pelas operárias de *Atta laevigata* após a aplicação dos tratamentos com timol no fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.....40
- Figura 2.5 - Curvas de probabilidade de sobrevivência para operárias de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em diferentes concentrações de timol.....41
- Figura 3.1 - Exposição das operárias de *Atta laevigata* à isca (A) e oferta da esponja fúngica para as operárias, após a retirada da dieta com os tratamentos (B).....51
- Figura 3.2 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) submetidas a diferentes concentrações de rotenona (0,01%, 0,1%, 0,3%, 1,0%) e ao tratamento controle (sem rotenona), ao longo de 21 dias de avaliação.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Valor do teste de Log-rank ou Mantel Haenszel para a análise de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) em função dos tratamentos.....	29
Tabela 2.1 - Sistema de avaliação utilizado para análise do lixo produzido retirado pelas operárias de <i>Atta laevigata</i>	38
Tabela 2.2 Estado de degradação do fungo simbionte <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	39
Tabela 2.3 Mortalidade das operárias de <i>Atta laevigata</i> e incorporação de folhas no fungo simbionte.....	39
Tabela 2.4 Intensidade de corte de folhas pelas operárias de <i>Atta laevigata</i>	39
Tabela 2.5 Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta laevigata</i> (Hymenoptera: Formicidae) expostas a diferentes concentrações de timol.....	42
Tabela 2.6 Valores de p do teste de Log-rank (Mantel-Haenszel) entre os tratamentos com timol na sobrevivência de operárias de <i>Atta laevigata</i>	41
Tabela 2.7 Análise de Deviância para a variável “fungo degradado” de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	42
Tabela 3.1 - Valores da análise de sobrevivência para operárias de <i>Atta laevigata</i> (Hymenoptera: Formicidae) em função dos tratamentos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
%	Porcentagem
A.	<i>Atta</i>
±	Mais ou menos
Fig.	Figura
L.	<i>Leucoagaricus</i>
TFD	Taxa de falsa descoberta
T	Tratamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
3	ARTIGO 1 - ATIVIDADE INSETICIDA DO ALCALOIDE OXIMATRINE ÀS OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE).....	23
3.1	RESUMO.....	23
3.2	ABSTRACT.....	23
3.3	INTRODUÇÃO.....	24
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.5	RESULTADOS.....	27
3.6	DISCUSSÃO.....	28
3.7	AGRADECIMENTOS.....	29
3.8	CONFLITO DE INTERESSES.....	29
3.9	CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	29
3.10	REFERÊNCIAS.....	29
4	ARTIGO 2 - EFEITO INSETICIDA E FUNGICIDA DO TIMOL EM OPERÁRIAS E NO FUNGO SIMBIONTE DE <i>Atta laevigata</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE).....	33
4.1	RESUMO.....	34
4.2	ABSTRACT.....	35
4.3	INTRODUÇÃO.....	35
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.5	RESULTADOS.....	41
4.6	DISCUSSÃO.....	43
4.7	DECLARAÇÕES E AFIRMAÇÕES.....	44
4.8	AGRADECIMENTOS.....	44
4.9	REFERÊNCIAS.....	45
5	ARTIGO 3 - TOXICIDADE DA ROTENONA A OPERÁRIAS DE <i>Atta laevigata</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE).....	47
5.1	RESUMO.....	48
5.2	ABSTRACT.....	49
5.3	INTRODUÇÃO.....	49

5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.5	RESULTADOS.....	52
5.6	DISCUSSÃO.....	54
5.7	FINANCIAMENTO.....	56
5.7	AGRADECIMENTOS.....	56
5.8	CONFLITO DE INTERESSES.....	56
5.9	CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	58
5.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex* são consideradas pragas de elevada relevância econômica no Brasil, devido à atividade de forrageamento durante todo o ano e aos complexos padrões comportamentais. Essa característica representa um desafio constante para os produtores, em razão dos danos que podem causar à produção (Silva-Pinhati et al., 2004; Marsaro et al., 2007; Zanetti et al., 2014; Cristiano et al., 2020).

Esses insetos são polí-fagos, cortam folhas frescas de diversas espécies vegetais e as transportam para o interior dos ninhos, onde cultivam o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, responsável por prover nutrientes à colônia por meio de uma relação mutualística (Della Lucia & Souza, 2011). Devido a esse hábito de desfolha, causam grandes prejuízos em cultivos agrícolas, florestais e pastagens no Brasil (Fujihara et al., 2013).

Nos cultivos agrícolas, o impacto econômico causado pelas formigas cortadeiras é bastante expressivo. Dependendo da fase fenológica da cultura, esses insetos podem comprometer significativamente o desenvolvimento das plantas, ocasionando desfolhas de até 15% em culturas agrícolas (Vasconcelos & Cherrett, 1997; Urbas et al., 2007). Essa taxa de remoção de biomassa foliar afeta diretamente o acúmulo de carbono e o crescimento da planta, podendo reduzir a produtividade final em diversos sistemas agrícolas (Leal et al., 2014).

Em áreas de cultivos florestais, especialmente na implantação de povoamentos de espécies, como *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp., os danos são mais evidentes em plantas jovens, com idade entre um e três anos. Nos primeiros meses após o plantio, os danos causados por essas formigas podem ser irreversíveis, devido à alta suscetibilidade das mudas nessa fase inicial de desenvolvimento (Vasconcelos & Cherrett, 1997). Estudos mostram que ataques intensos em áreas recém-plantadas podem comprometer completamente a formação do povoamento, exigindo replantio e aumentando consideravelmente os custos de produção (Zanetti et al., 2003; Souza et al., 2012).

Além disso, a presença de ninhos de *Atta* spp. em densidades elevadas está associada à redução de produtividade em áreas comerciais. Em plantações de eucalipto, estima-se que cada hectare adicional ocupado por formigueiros pode resultar em perda média de 0,13 m³ ha⁻¹ na produção de madeira, o que corresponde a uma área economicamente não aproveitável de até 39,2 m² ha⁻¹ (Souza et al., 2012).

As formigas cortadeiras apresentam elevada complexidade comportamental e organizacional, decorrente de sua condição de insetos eusociais, o que torna seu controle um dos principais desafios enfrentados pelos agricultores. Essa complexidade está associada a uma estrutura social bem definida, caracterizada por divisão de trabalho, comunicação química por feromônios, comportamento coletivo de defesa, hábitos rigorosos de higiene dentro da colônia e notável capacidade de detectar e evitar substâncias químicas tóxicas. Esses fatores favorecem a sobrevivência das colônias e dificultam a eficácia dos métodos de controle (Della Lucia & Souza, 2011; Della Lucia et al., 2014). Nesse contexto, compreender o comportamento desses insetos e a complexidade funcional de suas colônias é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficazes e sustentáveis. Entre os principais métodos utilizados no combate às formigas cortadeiras, destacam-se os mecânicos, culturais, biológicos e químicos, que podem ser empregados de forma isolada ou integrada, conforme as características da área infestada (Britto et al., 2016).

O controle químico continua sendo o método mais amplamente empregado no combate às formigas cortadeiras, principalmente em razão de sua elevada eficácia e da facilidade de aplicação em grandes áreas (Britto et al., 2016). Os principais ingredientes ativos utilizados nesse tipo de manejo apresentam diferentes modos de ação. Entre eles, destaca-se a sulfluramida, um inseticida de ação lenta que atua por ingestão; após ser metabolizada pelas formigas, interfere na fosforilação oxidativa, comprometendo a produção de energia celular, o que leva à morte gradual das operárias e, posteriormente, da rainha. O fipronil atua como bloqueador dos canais de cloro, mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), resultando em hiperexcitação do sistema nervoso central, convulsões e morte. Já a deltametrina, pertencente ao grupo dos piretroides, age sobre os canais de sódio da membrana neural, mantendo-os abertos e provocando descargas nervosas contínuas, o que leva à paralisia e morte dos insetos, tanto por contato quanto por ingestão. O clorpirifós, por sua vez, é um organofosforado que inibe irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, acumulando acetilcolina nas sinapses e causando disfunções neuromusculares, que também culminam em paralisia e morte (Britto et al., 2016).

A sulfluramida, frequentemente utilizada em iscas granuladas para o controle de formigas cortadeiras, apresenta riscos ambientais significativos. Após sua aplicação, o ingrediente é metabolizado ou degradado no ambiente, transformando-se em perfluorooctanossulfonato (PFOS), uma substância extremamente persistente e bioacumulativa. O PFOS pode ser facilmente carregado pela água da chuva, infiltrando-se

no solo e atingindo lençóis freáticos e corpos d'água, representando uma ameaça à qualidade da água e à saúde ambiental (Nascimento et al., 2018; Guida et al., 2025).

A crescente preocupação com os impactos ambientais da sulfluramida levou a discussões regulatórias em âmbito internacional. O PFOS é classificado como poluente orgânico persistente e seu uso foi restrito globalmente pela Convenção de Estocolmo, da qual o Brasil é signatário desde 2004 (UNEP, 2009). Diante desse cenário, o Brasil passou a restringir o uso da sulfluramida por meio de resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que vêm estabelecendo prazos para sua eliminação gradual, especialmente em contextos que apresentem risco de contaminação ambiental, conforme comunicado nº 22927367/2025-DIQUA, de 1º de abril de 2025 (IBAMA, 2025).

Diante desse panorama, torna-se essencial a busca por alternativas viáveis que aliem eficácia no controle das formigas cortadeiras e equilíbrio entre desenvolvimento econômico, responsabilidade social e preservação ambiental. Entre as opções promissoras, destaca-se o uso de inseticidas botânicos (Souza et al., 2017). Esses inseticidas são extraídos de plantas que produzem compostos bioativos naturais, como alcaloides, terpenoides, flavonoides e compostos fenólicos, que atuam de forma específica sobre o sistema nervoso, digestivo ou reprodutivo dos insetos, reduzindo a resistência e os efeitos colaterais observados com inseticidas sintéticos (Isman, 2006; Pavela & Benelli, 2016).

O alcaloide oximatrine, extraído de plantas do gênero *Sophora*, atua no sistema nervoso central dos insetos, nos receptores de acetilcolina, interrompendo a transmissão do impulso nervoso (Wink et al., 1998). Além disso, afeta negativamente a muda dos insetos, ao bloquear a atividade de enzimas quitinases que degradam a quitina presente na cutícula e na membrana peritrófica durante o processo de muda (Ali et al., 2017), promovendo uma hiperexcitação neuronal, seguida de paralisia e, eventualmente, morte (Rabea et al., 2010).

A ação retardada é uma característica desejável para a formulação do inseticida em iscas tóxicas utilizadas no controle de formigas cortadeiras (Chen & Oi, 2020), pois garante que os sintomas de intoxicação apareçam após a distribuição das iscas no ninho, aumentando o alcance e a eficácia do produto. Caso a substância seja de ação rápida, as operárias morrem logo após o contato ou ingestão, o que pode levar o restante da colônia a rejeitar a isca, identificando-a como perigosa. Dessa forma, substâncias com ação tóxica

progressiva são mais eficientes no controle de formigas cortadeiras, na formulação de iscas granuladas, do que compostos de ação imediata.

A rotenona apresenta ação inseticida por meio da inibição da cadeia respiratória mitocondrial, mais especificamente no complexo I (NADH: ubiquinona oxidoredutase), comprometendo a produção de energia e levando à morte celular (Singer & Ramsay, 1994; Sun et al., 2021). Esse ingrediente ativo atua de forma sistêmica sobre o sistema muscular e nervoso dos insetos, resultando em redução progressiva da atividade locomotora e da alimentação, efeitos que se intensificam ao longo de vários dias (Soto, 2013; Alécio et al., 2010). Essa ação lenta e cumulativa torna a rotenona especialmente promissora para o controle de formigas cortadeiras.

O timol, um monoterpene fenólico amplamente encontrado em óleos essenciais de plantas como *Thymus vulgaris*, tem se destacado por sua potente ação inseticida de natureza neurotóxica (Pavela & Benelli, 2016; Moraes et al., 2018). Esse composto inibe a atividade de enzimas detoxificantes, como carboxilesterases e citocromos P450, comprometendo os mecanismos fisiológicos que os insetos utilizam para neutralizar substâncias tóxicas (Ruttanaphan & Bullangpoti, 2022). Além da toxicidade aguda, o timol também apresenta efeitos subletais, que podem afetar negativamente parâmetros como crescimento, fecundidade, viabilidade reprodutiva e longevidade dos insetos, interferindo significativamente na dinâmica populacional da praga (Kucuk & Kaplan, 2023).

O fomento à pesquisa na área de inseticidas naturais e seus derivados é fundamental para o desenvolvimento de soluções que conciliem alta produtividade agrícola com conservação ambiental. Ingredientes ativos, como timol, oximatrina e rotenona, têm se destacado como alternativas promissoras, mas ainda requerem investigações aprofundadas quanto à eficácia, mecanismos de ação e impactos ecológicos. Resultados preliminares indicam que essas substâncias apresentam atividade inseticida relevante contra insetos sociais, como as formigas cortadeiras. Dada a complexidade social e ecológica dessas formigas, pesquisas adicionais são fundamentais para embasar táticas mais sustentáveis de manejo.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inseticida dos ingredientes ativos rotenona, oximatrina e timol sobre operárias de espécies de *Atta* spp., bem como investigar os efeitos do timol sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alécio, M.R.; Fazolin, M.; Netto, R.A.C.; Catani, V.; Estrela, J.L.V.; Alves, S.B.; Correa, R.S.; Neto, R.C.A.; Gonzaga, A.D. Ação inseticida do extrato de *Derris amazonica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta Amazônica**, v.40, n.4, p.719-728, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000400012>
- Ali, S.; Zhang, C.; Wang, Z.; Wang, X.M.; Wu, J.H.; Cuthbertson, A.G.; Shao, Z.; Qiu, B.L. Toxicological and biochemical basis of synergism between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the insecticide matrine against *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Scientific Reports**, v.7, 46558, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep46558>
- Britto, J.S.; Forti, L.C.; Oliveira, M.A.; Zanetti, R.; Wilcken, C.F.; Zanuncio, J.C.; Loeck, A.E.; Caldato, N.; Nagamoto, N.S.; Lemes, P.G.; Camargo, R.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, n.1, p.11–92, 2016.
- Chen, J.; Oi, D.H. Naturally occurring compounds/materials as alternatives to synthetic chemical insecticides for use in fire ant management. **Insects**, v.11, n.11, p.758, 2020. <https://doi.org/10.3390/insects11110758>
- Cristiano, M.P.; Cardoso, D.C.; Sandoval-Gómez, V.E.; Simões-Gomes, F.C. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, v.59, n.4, p.643-676, 2020. <https://doi.org/10.1111/aen.12474>
- Della Lucia, T.M.C.; Gandra, L.C.; Guedes, R.N.C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p.14–23, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>
- Della Lucia, T.M.C.; Souza, D.J. **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2011. p.27-48.
- Fujihara, R.T.; De Souza Silva, M.; Forti, L.C. **Manejo de formigas cortadeiras**. Tópicos especiais em proteção de plantas. Botucatu: FEPAF, 2013. 103 p. ISBN: 978-85-98187-57-0
- Guida, Y.; Barizon, R.R.M.; Kummrow, F.; Menezes-Sousa, D.; Assalin, M.R.; Rosa, M.A.; Almeida Pazianotto, R.A.; De Oliveira Lana, J.T. Environmental occurrence of perfluorooctanesulfonic acid from sulfluramid-based ant bait usage and its ecotoxicological risks. **Environmental Research**, v.2, 121851, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121851>
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Comunicado nº 22927367/2025 DIQUA, de 1º de abril de 2025. Diretrizes para manejo e restrição de uso da sulfluramida em áreas de risco hídrico. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, p.107, 3 abr. 2025.

- Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.45–66, 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Kucuk, M.E.; Kaplan, A. The effect of thymol on the development of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Applied Biological Sciences**, v.17, n.2, p.320–327, 2023.
- Leal, I.R.; Wirth, R.; Tabarelli, M. The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified Neotropical forests. **Biotropica**, p.516–528, 2014. <https://doi.org/10.1111/btp.12126>
- Marsaro, A.L.; Molina-Rugama, A.J.; Lima, C.A.; Della Lucia, T.M.C. Preferência de corte de *Eucalyptus* spp. por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, v.17, n.2, p.171-174, 2007.
- Moraes, V.R.S.; De Lima Nogueira, P.C.; Costa, E.V.; De Souza Santos, L.; Silva, V.R.; Bomfim, L.M.; Bezerra, D.P. Phytochemical and biological properties of *Lippia gracilis*. In: **Anticancer plants: properties and application**, v.1, p.37-55, 2018.
- Nascimento, R.A.; Nunoo, D.B.O.; Bizkarguenaga, E.; Schultes, L.; Zabaleta, I.; Benskin, J.P. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: a source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. **Environmental Pollution**, p.1436–1443, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.059>
- Pavela, R.; Benelli, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**, v.21, n.12, p.1000–1007, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Rabea, E.I.; Nasr, H.M.; Badawy, M.E. Toxic effect and biochemical study of chlorfluazuron, oximatrine, and spinosad on honey bees (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p.722-732, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9403-y>
- Ruttanaphan, T.; Bullangpoti, V. The potential use of thymol and (R)-(+)-pulegone as detoxifying enzyme inhibitors against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Phytoparasitica**, v.50, n.4, p.913-920, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12600-022-00989-1>
- Silva-Pinhati, A.C.O.; Bacci Jr, M.; Hinkle, G.; Sogin, M.L.; Pagnocca, F.C.; Martins, V.G.; Hebling, M.J.A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1463-1472, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001000013>
- Singer, T.P.; Ramsay, R.R. The reaction site of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.198-202, 1994. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90184-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90184-8)
- Soto, A. Manejo alternativo de ácaros plagas. **Revista de Ciências Agrícolas**, v.30, n.2, p.34-44, 2013.
- Souza, B.R.; Coelho, G.M.; Rocha, E.C.; Jesus, F.G.; Menezes, A.C.S.; Araújo, M.S. Topical toxicity of *Esenbeckia pumila* extracts on leaf-cutting ants *Atta laevigata* and

Acromyrmex balzani. **Journal of Agricultural Science**, v.9, n.12, p.248-258, 2017.
<https://doi.org/10.5539/jas.v9n12p248>

Souza, D.J.; Moreira, D.D.O.; Araújo, M.S. Formigas cortadeiras e o impacto sobre plantações de eucalipto no Brasil. **Revista Árvore**, v.36, n.6, p.1089–1098, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0100-67622012000600014>

Sun, Z.; Xue, L.; Li, Y.; Cui, G.; Sun, R.; Hu, M.; Zhong, G. Rotenone-induced necrosis in insect cells via cytoplasmic membrane damage and mitochondrial dysfunction. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.173, 104801, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104801>

UNEP – United Nations Environment Programme. **Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Geneva: UNEP, 2009.

Urbas, P.; Araújo Junior, 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.

Vasconcelos, H.L.; Cherrett, J.M. Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of vegetation type and topography. **Journal of Tropical Ecology**, v.13, p.357-370, 1997. <https://doi.org/10.1017/S0266467400010588>

Wink, M.; Schmeller, T.; Latz-Brüning, B. Modes of action of alleochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. **Journal of Chemical Ecology**, v.24, p.1881–1937, 1998.
<https://doi.org/10.1023/A:1022315802264>

Zanetti, R.; Delabie, J.H.C.; Santos, J.C. Formigas cortadeiras: impacto econômico e métodos de controle. **Neotropical Entomology**, v.32, n.2, p.123–132, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2003000200001>

Zanetti, R.E.; Zanuncio, J.C.; Santos, J.C.; Silva, W.L.P.; Ribeiro, G.T.; Lemes, P.G. An overview of integrated management of leaf-cutting ant (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v.5, n.3, p.439-454, 2014.
<https://doi.org/10.3390/f5030439>

ARTIGO 1

**ATIVIDADE INSETICIDA DO ALCALOIDE OXIMATRINE ÀS OPERÁRIAS
DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

**ATIVIDADE INSETICIDA DO ALCALOIDE OXIMATRINE ÀS OPERÁRIAS DE *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Talytha Ravenna de Melo Souza^{1*}, Maria Aparecida Castellani¹, Luiz Carlos Forti², Roberto da Silva Camargo², Carlos Alberto Oliveira de Matos³, Ellen Rainha da Silva¹, Julian Alberto Sabbattini⁴, Rita de Cássia Antunes Lima de Paula⁵, Aldenise Alves Moreira¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista, BA, Brasil. E-mail: talyraven19@gmail.com; castellani@uesb.edu.br; ellenrainha0@gmail.com; a.moreira@uesb.edu.br

² Laboratório de Insetos Sociais-Pragas, Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, FCA, Caixa Postal 237, 18603-970. E-mail: camargosauva@gmail.com

³ Instituto de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), *Campus* de Itapeva, Itapeva, Brasil. E-mail: carlos.matos@unesp.br

⁴ Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Entre Ríos, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Ruta n°. 11 Km, 10.5, 3100, Ouro Verde, Argentina. E-mail: julian.sabbattini@uner.edu.ar

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, Vitória da Conquista, BA, Brasil. E-mail: rcassia@uesb.edu.br

*Autor Correspondente: Talytha Ravenna de Melo Souza, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Estrada do Bem Querer, Km 04, Caixa Postal 95, Bairro Rural, 45031-900, Vitória da Conquista, BA, Brasil. E-mail: talyraven19@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2362-9624>

Resumo

As formigas cortadeiras causam grandes prejuízos em plantações agrícolas, florestais e pastagens, especialmente em áreas recém-implantadas, motivando pesquisas por alternativas ao controle químico tradicional, a fim de minimizar os impactos ambientais e a saúde humana. Este estudo avaliou a atividade inseticida da rotenona sobre operárias de *Atta laevigata* por ingestão, em condições laboratoriais. Foram testadas as concentrações de 0,01%, 0,1%, 0,3% e 1% de rotenona, além de um controle sem ingrediente ativo. A mortalidade das operárias foi registrada ao longo de 21 dias, após a exposição às dietas tratadas. As curvas de sobrevivência demonstraram que as operárias expostas à rotenona apresentaram redução progressiva da probabilidade de sobrevivência em todos os tratamentos. A concentração de 0,01% resultou em mais de 50% de mortalidade, após 17 dias de exposição. Esses resultados indicam efeito tóxico da rotenona em baixa concentração sobre operárias de *A. laevigata*, representando uma característica promissora para novos estudos sobre seu uso em formulação de iscas tóxicas.

Palavras-chave: bioinseticida; controle; formigas cortadeiras, oxymatrin

Insecticidal Activity of the Alkaloid Oxymatrine on *Atta sexdens* Workers (Hymenoptera: Formicidae)

Abstract

Leaf-cutting ants of the genus *Atta* represent one of the main agricultural, forestry, and pasture pests in Latin America and are traditionally controlled with synthetic insecticides such as sulfluramid and fipronil, which, although effective, pose environmental risks. In this context, botanical insecticides emerge as promising alternatives. Oxymatrine, an alkaloid extracted from *Sophora flavescens*, shows low environmental toxicity, selectivity for natural enemies, and is already used in other countries for pest insect control. This study aimed to evaluate, under laboratory conditions, the insecticidal activity of oxymatrine by ingestion against *Atta sexdens* workers. Four concentrations (0.01%, 0.03%, 0.05%, and 0.1%) were tested, incorporated into toxic baits, with a negative control (without active ingredient) and a positive control (0.1% sulfluramid). After 24 hours of exposure, the ants were fed with symbiotic fungal sponge and monitored for 21 days. The results showed that the higher oxymatrine concentrations significantly reduced worker survival over time, with increasing mortality between days 14 and 21, suggesting a delayed toxic effect—a desirable feature for controlling leaf-cutting ants with toxic baits. These findings indicate its potential as an active ingredient in baits, providing prospects for future studies in laboratory and field colonies.

Keywords: bioinsecticide; control; leaf-cutting ants

Introdução

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* mantêm uma relação mutualística altamente especializada com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. As operárias coletam material vegetal fresco, predominantemente folhas, para o cultivo e manutenção do jardim fúngico, que serve como fonte primária de alimento, sobretudo para as fases jovens da colônia. Esse comportamento de forrageamento intensivo resulta em extensivos danos econômicos à agricultura, uma vez que grandes volumes de biomassa vegetal são removidos continuamente das plantações (Silva et al., 2021; Aylward et al., 2012).

A desfolha promovida pelas formigas cortadeiras, principalmente as do gênero *Atta*, causa impactos econômicos significativos em sistemas agrícolas e florestais. Esses insetos removem grandes quantidades de biomassa vegetal para o cultivo do fungo simbiote, o que compromete o desenvolvimento de culturas comerciais. Os danos são especialmente severos em viveiros, pomares em formação e plantações recém-estabelecidas, como as de manga (*Mangifera indica*), laranja (*Citrus sinensis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.), onde a perda de folhagem reduz a capacidade fotossintética das plantas e pode levar à morte de mudas (Forti et al., 2014; Zanetti et al., 2017; Corrêa et al., 2022).

Devido aos prejuízos significativos causados pelas formigas cortadeiras, o controle desses insetos é amplamente realizado por meio da aplicação de iscas formicidas, que apresentam como principais ingredientes ativos a sulfluramida e o fipronil. Embora ambos os compostos sejam eficazes na redução das populações, sua utilização levanta sérias preocupações ambientais e toxicológicas. A sulfluramida, por exemplo, é um composto organofluorado cujo metabólito final, o ácido perfluorooctanoico (PFOA),

apresenta alta persistência ambiental, potencial bioacumulativo e toxicidade para humanos e fauna (Oliveira et al., 2020; Trier et al., 2011). O fipronil, por sua vez, está associado à alta toxicidade aguda e crônica para organismos não alvo, como abelhas, peixes e aves, além de interferir no sistema nervoso central dos insetos por bloqueio dos canais de cloro, mediados por GABA (Simon-Delso et al., 2015; Goulson, 2013).

Nesse aspecto, os inseticidas botânicos têm se destacado como alternativas promissoras aos compostos químicos sintéticos no controle de pragas, principalmente em razão de suas propriedades bioativas específicas. Esses produtos naturais apresentam toxicidade direcionada aos insetos-praga, menor impacto sobre inimigos naturais, rápida degradação no ambiente, reduzida toxicidade para organismos não alvo e maior segurança para os seres humanos (Isman, 2006; Divekar et al., 2023).

A oximatrine tem se destacado como uma alternativa promissora no manejo de pragas, incluindo formigas cortadeiras. Trata-se de um alcaloide quinolizidínico ($C_{15}H_{24}N_2O_2$), extraído da planta medicinal *Sophora flavescens* (Kushen), tradicionalmente utilizada na medicina chinesa. Diversos estudos demonstram que essa substância possui um amplo espectro de atividades biológicas, atuando como inseticida, fungicida, antiviral e anti-inflamatório (Brilinger et al., 2024; Gadallah et al., 2014). O mecanismo de ação da oximatrine em insetos pode ocorrer tanto por contato direto quanto por ingestão. Esse alcaloide atua principalmente sobre o sistema nervoso central, causando inibição da respiração celular, desorientação motora e morte. Além disso, a oximatrine pode alterar o comportamento locomotor, reduzir a atividade alimentar e interferir no metabolismo dos insetos. Diversos estudos também apontam sua ação antialimentar significativa, com redução expressiva na ingestão de alimento após a exposição (Mao e Henderson, 2007; Verma et al., 2009; Gadallah et al., 2014).

A oximatrine não apresenta efeitos citotóxicos ou genotóxicos em plantas, o que reforça seu potencial como uma ferramenta segura no desenvolvimento de biopesticidas (Akdeniz & Ozmen, 2011). Essa característica, aliada à sua ação inseticida, torna a oximatrine um ingrediente ativo promissor para a formulação de iscas tóxicas. Considerando a necessidade de alternativas eficazes e de baixo impacto ambiental para o controle de formigas cortadeiras, este estudo teve como objetivo avaliar, em condições de laboratório, a atividade inseticida da oximatrine às operárias de *Atta sexdens* por ingestão.

Material e métodos

O bioensaio foi realizado no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Foram utilizadas operárias de colônias de *A. sexdens*, mantidas sob condições controladas (25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h). As colônias foram alimentadas diariamente com folhas de *Acalypha* sp. (Euphorbiaceae) e, quando necessário (em períodos de alta umidade nas câmaras), com milho triturado, visando o cultivo do fungo simbionte *L. gongylophorus*, principal alimento das larvas e importante fonte de nutrientes para as operárias.

As iscas foram preparadas utilizando oximatrine (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Cajamar, Brasil) como ingrediente ativo. Foram testadas quatro concentrações de oximatrine (0,01%, 0,03%, 0,05% e 0,1%), além de um controle negativo (sem ingrediente ativo) e um controle positivo contendo sulfluramida 0,1%. A metodologia foi adaptada de Teixeira et al. (2023). As substâncias foram diluídas em solução aquosa de sacarose a 10% e misturadas à polpa cítrica até a obtenção de uma pasta homogênea (Figura 1A).

A matéria-prima utilizada para a obtenção da polpa cítrica foi composta por laranjas (*Citrus sinensis* L.) provenientes de cultivo orgânico, localizado no município de Vitória da Conquista (BA), a fim de evitar a presença de resíduos tóxicos nos frutos. Para a preparação, as cascas das laranjas foram removidas, o suco extraído e o albedo e o bagaço desidratados em estufa a 50 °C, por 72 horas. Posteriormente, o material foi triturado até a obtenção de um pó fino, utilizado como base das iscas.

O experimento foi conduzido em placas de Petri contendo papel filtro umedecido e um pedaço de papel alumínio para posicionamento da dieta (Teixeira et al., 2023). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, totalizando 24 parcelas. Cada parcela foi composta por uma placa contendo 20 operárias de *A. sexdens*.

As iscas (cerca de 1 grama por repetição) foram ofertadas por 24 horas (Figura 1B). Após esse período, as dietas foram retiradas e substituídas por fungo simbionte, contendo aproximadamente 2,0 cm³ com cerca de 20 jardineiras (operárias de pequeno porte) responsáveis pelo cultivo de *L. gongylophorus*. As esponjas eram substituídas a cada cinco dias para garantir a qualidade do substrato alimentar. Vale destacar que os gongilídeos produzidos pelo fungo são rapidamente degradados na ausência de manutenção vegetal, sendo fonte fundamental de nutrientes para as operárias.

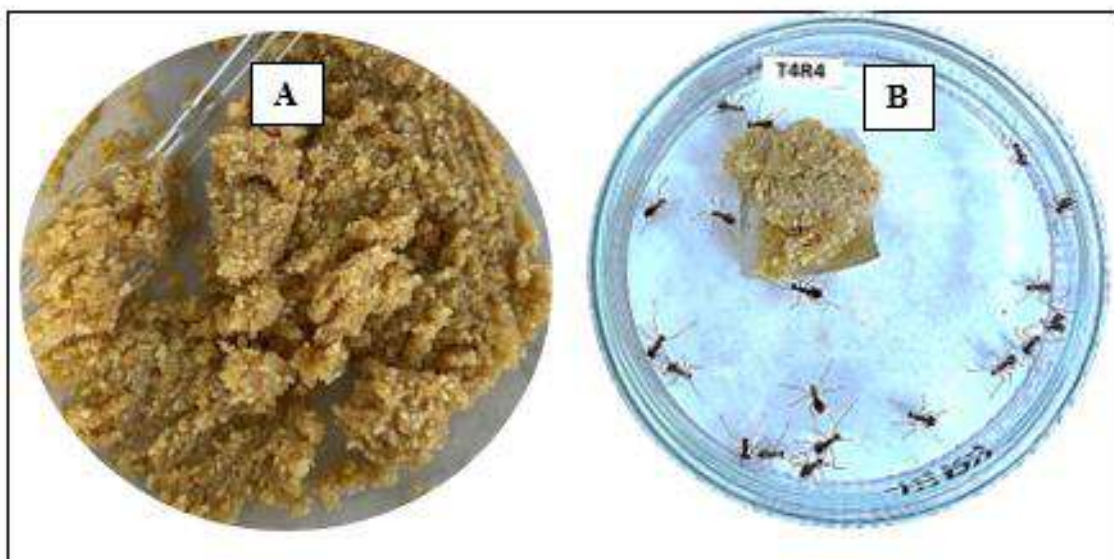


Figura 1: Isca de polpa cítrica adicionada de sacarose 10% (A) e detalhe da placa de Petri com operárias de *Atta sexdens* e isca com oximatrine (B)

A mortalidade das operárias foi avaliada por meio da contagem de indivíduos mortos ao longo de 21 dias, após a exposição inicial às iscas. As avaliações foram realizadas nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21, conforme protocolo adaptado de Nagamoto et al. (2004).

Os dados de sobrevivência acumulada ao longo do tempo foram analisados por meio de curvas de sobrevivência Kaplan–Meier (1958), com comparação entre os tratamentos, realizada pelo teste de Log-Rank (Mantel–Cox), ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os valores de P foram ajustados pelo método de Benjamini e Hochberg (1995), que controla a taxa de falsa descoberta. As análises estatísticas e a elaboração dos gráficos foram conduzidas no ambiente estatístico R (R Core Team, 2021), versão 4.1.2,

utilizando os pacotes survival, survminer e ggplot2. O ambiente de desenvolvimento utilizado foi o RStudio versão 2022.02.3.

Resultados

As curvas de sobrevivência das operárias de *A. sexdens*, expostas a diferentes concentrações de oximatrine, apresentaram elevada probabilidade de sobrevivência nos primeiros dias de avaliação, seguida por uma redução progressiva ao longo do tempo (Figura 2). O controle positivo (sulfluramida 0,1%) apresentou um aumento acentuado da mortalidade a partir do décimo primeiro dia, com probabilidade de sobrevivência chegando a zero ao final do período experimental.

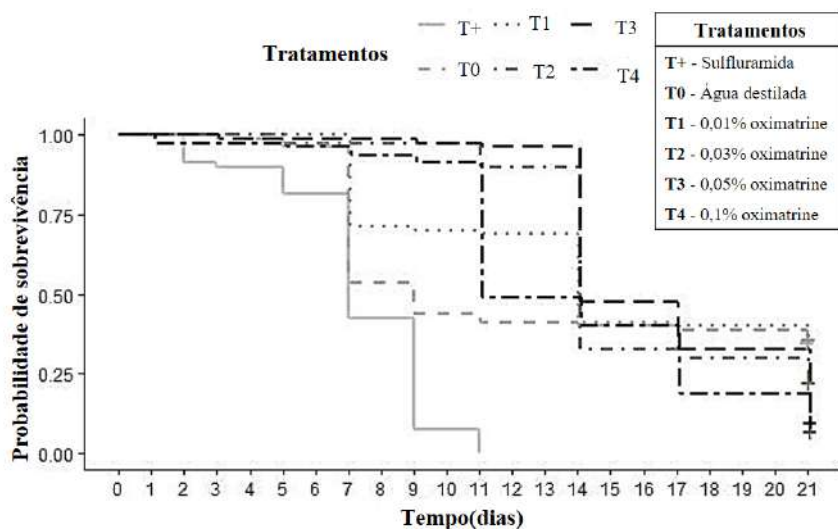


Figura 2. Curvas de probabilidade de sobrevivência para operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em diferentes tratamentos.

Nos tratamentos com oximatrine, com 21 dias, as concentrações de 0,05% e 0,1% (T3 e T4, respectivamente) apresentaram as menores probabilidades de sobrevivência, inferiores a 25% (Figura 2). Em todos os tratamentos, exceto no controle positivo, ainda foram observadas operárias vivas ao final dos 21 dias.

A taxa de sobrevivência variou entre 15% e 40% nos tratamentos com oximatrine, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre as diferentes concentrações avaliadas (Tabela 1). Contudo, todos os tratamentos com oximatrine diferiram significativamente do controle positivo (sulfluramida). O tratamento com 0,1% de oximatrine (T4) também apresentou diferença significativa em relação a todos os demais tratamentos, exceto ao controle negativo (T0), indicando um efeito inseticida relevante nesta concentração.

Tabela 1. Valor do teste de Log-rank ou Mantel Haenszel para a análise de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em função dos tratamentos

	T+	T0	T1	T2	T3
T0	4,93 E-08	NA	NA	NA	NA
T1	2,12E-18	0,33864	NA	NA	NA
T2	3,44E-34	0,283126	0,774706	NA	NA
T3	1,15E-35	0,774706	0,211035	0,593524	NA
T4	8,55E-26	0,541834	0,018026	0,005628	0,01831

Tratamentos: T+ sulfluramida; T0 - água destilada; T1-0,01%; T2 - 0,03%; T3 - 0,05% e T4 - 0,1%.

Discussão

Inseticidas botânicos, como a oximatrine, são cada vez mais consideradas alternativas viáveis em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), devido ao seu menor impacto ambiental em comparação aos inseticidas sintéticos tradicionais, embora seus efeitos ainda necessitem de aprofundamento (Rabea et al., 2010). No presente estudo, as maiores concentrações de oximatrine (0,05% e 0,1%) foram as que provocaram maior toxicidade às operárias de *A. sexdens*, com probabilidade de sobrevivência inferior a 25%, evidenciando sua ação inseticida (Gholami e Sadeghi, 2016).

Estudos prévios confirmam que a oximatrine atua tanto por contato quanto por ingestão (Gholami e Sadeghi, 2016), mostrando atividade tóxica contra diversos artrópodes. Por exemplo, Al-Hab e Al-Zurfi (2023) relataram efeito biocida em adultos e larvas do besouro *Oryzaephilus surinamensis*, enquanto outros trabalhos apontam seu uso contra pragas como *Frankliniella occidentalis* (Gholami e Sadeghi, 2016), *Spodoptera littoralis* (El-Mageed e Shalaby, 2011), e vetores como *Culex pipiens* e *Aedes albopictus* (Mohamed et al., 2023; Ang et al., 2023).

Além disso, a toxicidade da oximatrine foi constatada em insetos eusociais, incluindo formigas picadoras *Tetramorium aculeatum* (Kidanu et al., 2021) e abelhas *Apis mellifera*, com os quais foi observada a inibição de enzimas fisiológicas essenciais (Rabea et al., 2010). Em cupins subterrâneos, essa substância mostrou efeito tóxico prolongado e inibição alimentar por até 12 meses (Lixin e Gregg, 2007).

Considerando a alta organização social das formigas cortadeiras, a ação retardada da oximatrine observada, com mortalidade inicial baixa e aumento progressivo entre 14 e 21 dias, é fundamental para o sucesso do controle por iscas, permitindo a dispersão do princípio ativo na colônia antes da morte dos indivíduos (Chen e Oi, 2020). A Instrução Normativa do Ministério da Agricultura (Brasil, 2011) estipula que um ingrediente ativo promissor deve apresentar mortalidade inferior a 15% nas primeiras 24 horas e superior a 90% após 21 dias; neste estudo, a oximatrine cumpriu parcialmente esse critério, o que pode ser atribuído às concentrações utilizadas.

O efeito inseticida da oximatrine parece estar relacionado à inibição da acetilcolinesterase, causando acúmulo de acetilcolina e hiperexcitação do sistema nervoso, levando à morte do inseto (Rabea et al., 2010; Liu et al., 2008; Lv et al., 2021). Além disso, o bloqueio gradual dos canais de sódio e potássio pela oximatrine interfere na propagação do impulso nervoso (Viswanathan et al., 2001; Abbott, 2020; Du et al., 2004; Bloomquist et al., 2018), enquanto a inibição da ATPase prejudica o transporte ativo de íons, resultando no colapso do sistema nervoso (Rabea et al., 2010). Esses mecanismos explicam a baixa mortalidade inicial e o aumento progressivo da letalidade ao longo do tempo.

Dessa forma, a oximatrine tem se mostrado uma ferramenta promissora para o controle de operárias de *A. sexdens*, apresentando a desejada ação retardada, essencial para o manejo de insetos eusociais. Entretanto, seu uso deve ser acompanhado de estudos adicionais para avaliar impactos ecológicos e otimizar sua formulação e aplicação. Este estudo serve como base para futuras pesquisas em laboratório e campo, inclusive com concentrações mais elevadas, visando maximizar os efeitos inseticidas e confirmar sua viabilidade como alternativa ambientalmente compatível.

Agradecimentos

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Vitória da Conquista; ao Laboratório de Entomologia da UESB; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Conflito de interesses

Nenhum

Contribuição dos autores

O manuscrito foi criado, elaborado e escrito por A. A. M., M. A. C., L. C.F. e R.S.C. O material, a preparação e a coleta de dados foram realizadas por T.R.M.S., E. R. S., A. A. M. e R. C. A. L. P. As análises foram realizadas por C. A. O. M., R. S. C. e J. A. S. O manuscrito foi revisado e editado por T.R.M.S., A. A. M., JAS, RCALP, CA. O. M. e L. C. F. Todos os autores contribuíram na revisão, edição do artigo e aprovaram o manuscrito final.

Referências

- Abbott, G. W. (2020). KCNQs: Ligand-and voltage-gated potassium channels. *Frontiers in Physiology*, *11*, 583.
- Akdeniz, D., & Ozmen, A. (2011). Efeitos antimetabólicos do biopesticida oximatrina. *Caryologia*, *64*(2), 117–120. <https://doi.org/10.1080/00087114.2011.10589771>
- Al-Hab, R. K. M. A., & Al-Zurfi, S. (2023). Evaluation of the efficiency of the biocide oximatrine in controlling the different roles of the saw-grain beetle *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Silvanidae: Coleoptera) in the laboratory. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1262*(3), 032058. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1262/3/032058>
- Ang, S., Liang, J., Zheng, W., Zhang, Z., Li, J., Yan, Z., Wong, W. L., Zhang, K., Chen, M., & Wu, P. (2023). Novel matrine derivatives as potential larvicidal agents against *Aedes albopictus*: Synthesis, biological evaluation, and mechanistic analysis. *Molecules*, *28*(7), 3035. <https://doi.org/10.3390/molecules28073035>
- Aylward, F. O., Burnum, K. E., Scott, J. J., Suen, G., Tringe, S. G., Adams, S. M., & Currie, C. R. (2012). Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *The ISME Journal*, *6*(9), 1688–1701. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.10>

- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300.
- Bloomquist, J. R., Jiang, S., Taylor-Wells, J., Yang, L., & Li, Y. X. (2018). Insecticidal activity and physiological actions of matrine, a plant natural product. In A. R. Gross & M. S. Peterson (Eds.), *Advances in the Biorational Control of Medical and Veterinary Pests* (pp. 175–186). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2018-1289.ch009>
- Brazil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011). Instrução normativa nº 42. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 1, 5–6.
- Brilinger, D., Fiedler, M., Arioli, C. J., Werner, S. S., Wertheim, B., & Boff, M. I. C. (2024). Exploring matrine and oximatrine as potential bioinsecticide to control *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Neotropical Entomology*, 54(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s13744-024-01224-8>
- Chen, J., & Oi, D. H. (2020). Naturally occurring compounds/materials as alternatives to synthetic chemical insecticides for use in fire ant management. *Insects*, 11(11), 758. <https://doi.org/10.3390/insects11110758>
- Corrêa, M. M., Fernandes, T. T., & Costa, A. N. (2022). Biology and management of leaf-cutting ants in agricultural and forestry systems. *Insects*, 13(3), 253. <https://doi.org/10.3390/insects13030253>
- Divekar, P. (2023). Botanical pesticides: An eco-friendly approach for management of insect pests. *Acta Scientific Agriculture*, 7, 75–81.
- El-Mageed, A. E. M. A., & Shalaby, S. E. M. (2011). Toxicity and biochemical impacts of some new insecticide mixtures on cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Plant Protection Science*, 47, 166–175.
- Forti, L. C., Andrade, A. P. P., Boaretto, M. A. C., Lopes, J. F. S., & Nagamoto, N. S. (2014). Leaf-cutting ants: Management and control in forest plantations. In F. E. Vega & R. W. Hofstetter (Eds.), *Pest Management in Forest Ecosystems* (pp. 163–190). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7365-4_7
- Gadallah, A., Mohammed, H., El-Metwally, M., & Abdel-Rahman, A. (2014). The effect of teflubenzuron and oximatrine on some biological aspects of *Sesamia critica* Led. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection and Pathology*, 5(7), 837–847. <https://doi.org/10.21608/jppp.2014.87997>
- Gholami, Z., & Sadeghi, A. (2016). Management strategies for western flower thrips in vegetable greenhouses in Iran: A review. *Plant Protection Science*, 52(2), 84–90.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457–481. <https://doi.org/10.2307/2281868>
- Kidanu, S., Azerefegne, F., & Mendesil, E. (2021). Natural insecticides for the control of urticating ant, *Tetramorium aculeatum* Mayr (Hymenoptera: Formicidae) in a coffee plantation of Southwestern Ethiopia. *Heliyon*, 7(3), e06546. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06546>
- Liu, L., Alam, M. S., Hirata, K., Matsuda, K., & Ozoe, Y. (2008). Actions of quinolizidine alkaloids on *Periplaneta americana* nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Management Science*, 64(12), 1222–1228. <https://doi.org/10.1002/ps.1637>

- Lixin, M., Henderson, G. (2007). Antifeedant activity and acute and residual toxicity of alkaloids from *Sophora flavescens* (Leguminosae) against Formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 866–870. <https://doi.org/10.1093/jee/100.3.866>
- Lv, M., Ma, Q., Zhang, S., & Xu, H. (2021). Agrochemical properties evaluation of some imines alkaloids of matrine/oximatrine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 48, 128246. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128246>
- Mohamed, H. A., Gad, H. A., & Oraby, H. K. (2023). Field larvicidal and pupicidal efficacy of the natural insecticide, oximatrine, against *Culex* species in Beni Suef Governorate, Egypt. *Journal of Natural Pesticide Research*, 4, 100030. <https://doi.org/10.1016/j.jnpr.2023.100030>
- Nagamoto, N. S., Forti, L. C., Andrade, A. P. P., Boaretto, M. A. C., & Wilcken, C. F. (2004). Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 44(2), 413–432.
- Oliveira, M. L., Dourado, D. M., & Forti, L. C. (2020). Sulfluramida no controle de formigas cortadeiras: riscos e alternativas. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 15(1), 65–78.
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rabea, E. I., Nasr, H. M., & Badawy, M. E. I. (2010). Toxic effect and biochemical study of chlorfluazuron, oximatrine, and spinosad on honey bees (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 722–732. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9403-y>
- Silva, R. G., Del-Claro, K., & Neves, F. S. (2021). Leaf-cutting ants (*Atta* spp. and *Acromyrmex* spp.): Behavior, ecological impacts, and pest management. *Journal of Pest Science*, 94, 711–725. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01349-4>
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J.-M., Chagnon, M., Downs, C., ... & Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Teixeira, F. V., de Melo Souza, T. R., Castellani, M. A., da Silva Camargo, R., Forti, L. C., De Paula, V. F., ... & Sabattini, J. A. (2023). Bioactivity of plant extracts against *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) workers by ingestion. *International Journal of Tropical Insect Science*, 43(4), 1227–1236.
- Trier, X., Granby, K., & Christensen, J. H. (2011). Polyfluorinated surfactants (PFS) in paper and board coatings for food packaging. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(7), 1108–1120. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0439-3>
- Verma, M., Sharma, S., & Prasad, R. (2009). Alternativas biológicas para o controle de cupins: uma revisão. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(8), 959–972.
- Viswanathan, P. C., Bezzina, C. R., George, A. L. Jr., Roden, D. M., Wilde, A. A., & Balsler, J. R. (2001). Gating-dependent mechanisms for flecainide action in SCN5A-linked arrhythmia syndromes. *Circulation*, 104(10), 1200–1205.
- Du, Y., Li, J., He, B., & Li, A. (2004). Effects of matrine on the sodium channel in central neurons of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 47(2), 189–192.
- Zanetti, R., Zanuncio, J. C., Santos, J. C., & Prezotti, L. (2017). Formigas cortadeiras em eucaliptais: manejo integrado e avanços tecnológicos. *Revista Árvore*, 41(4), e410410. <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000400010>

ARTIGO 2

EFEITO INSETICIDA E FUNGICIDA DO TIMOL EM OPERÁRIAS E NO FUNGO SIMBIONTE DE *Atta laevigata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

***Situação:** Submetido

EFEITO INSETICIDA E FUNGICIDA DO TIMOL EM OPERÁRIAS E NO FUNGO SIMBIONTE DE *Atta laevigata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Talytha Ravenna de Melo Souza^{1*}, Maria Aparecida Castellani¹, Luiz Carlos Forti², Roberto da Silva Camargo², Carlos Alberto Oliveira de Matos³, Ellen Rainha da Silva¹, Julian Alberto Sabbattini⁴, Aldenise Alves Moreira¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista, BA, Brasil. E-mail: talyraven19@gmail.com; castellani@uesb.edu.br; ellenrainha0@gmail.com; a.moreira@uesb.edu.br

² Laboratório de Insetos Sociais-Pragas, Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas, FCA, Caixa Postal 237, 18603-970. E-mail: camargosauva@gmail.com

³ Instituto de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), *Campus* de Itapeva, Itapeva, Brasil. E-mail: carlos.matos@unesp.br

⁴ Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Entre Ríos, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Ruta n°. 11 Km, 10.5, 3100, Ouro Verde, Argentina. E-mail: julian.sabbattini@uner.edu.ar

*Autor Correspondente: Talytha Ravenna de Melo Souza, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Estrada do Bem Querer, Km 04, Caixa

Resumo

Formigas cortadeiras do gênero *Atta* são pragas que causam um elevado impacto econômico, devido à desfolha de espécies agrícolas, florestais e pastagens, que são utilizadas no cultivo do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. O controle químico com iscas formicidas à base de sulfluramida é o método mais utilizado, contudo, seu uso é restringido por causa de riscos ambientais. Nesse aspecto, compostos botânicos, como o timol, um monoterpene fenólico com atividade inseticida e antimicrobiana, vêm sendo estudados como alternativa mais segura. Este trabalho avaliou a ação inseticida de diferentes concentrações de timol (0,01%, 0,1%, 0,3% e 1,0%), por ingestão, às operárias de *Atta laevigata*, bem como sua atividade no fungo simbiote *L. gongylophorus*. Pelos resultados obtidos, todas as concentrações testadas de timol reduziram significativamente a sobrevivência das operárias em comparação ao controle, com destaque para a concentração de 0,3%, que causou 100% de mortalidade até o 17º dia de avaliação. A ação foi progressiva e retardada, característica favorável para o uso em isca tóxica para formigas cortadeiras. Não foram observados efeitos significativos sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* nas concentrações e condições testadas. Diante disso, o timol apresenta-se como um ingrediente ativo com atividade inseticida por ingestão para espécie *A. laevigata* em condições de laboratório. No entanto, novos estudos em colônias de laboratório e campo devem ser realizados para possibilitar o desenvolvimento de bioinseticidas para o controle de formigas cortadeiras.

Palavras-chave: Controle químico; monoterpene fenólico; formigas cortadeiras; *Leucoagaricus gongylophorus*.

Insecticidal and Fungicidal Effect of Thymol on Workers and the Symbiotic Fungus of *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae)

Abstract

Leaf-cutting ants of the genus *Atta* are pests that cause significant economic impact due to the defoliation of agricultural, forestry, and pasture species, which are used for cultivating the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Chemical control using baits containing sulfluramid is the most commonly employed method; however, its use is restricted due to environmental risks. In this context, botanical compounds such as thymol, a phenolic monoterpene with insecticidal and antimicrobial activity, have been studied as a safer alternative. This study evaluated the insecticidal activity of different thymol concentrations (0.01%, 0.1%, 0.3%, and 1.0%) by ingestion against *Atta laevigata* workers, as well as its effect on the symbiotic fungus *L. gongylophorus*. The results showed that all tested thymol concentrations significantly reduced worker survival compared to the control, with the 0.3% concentration causing 100% mortality by the 17th day of evaluation. The effect was progressive and delayed, a favorable characteristic for use in toxic baits for leaf-cutting ants. No significant effects on the growth of the symbiotic fungus *L. gongylophorus* were observed at the tested concentrations and conditions. Therefore, thymol appears to be an active ingredient with insecticidal activity by ingestion for *A. laevigata* under laboratory conditions. However, further studies in laboratory and field colonies are required to enable the development of bioinsecticides for controlling leaf-cutting ants.

Keywords: Chemical control; phenolic monoterpene; leaf-cutting ants; *Leucoagaricus gongylophorus*.

Introdução

As formigas cortadeiras são insetos polívoros que cortam folhas frescas de culturas agrícolas, florestais e pastagens para servirem de nutriente para o desenvolvimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Souza et al., 2011). Por conta do seu hábito de desfolha, essas formigas causam grandes perdas econômicas, sendo consideradas a praga mais importante nas florestas de eucalipto e pinos (Souza et al., 2011).

As formas de controle da praga incluem métodos mecânicos, físico-culturais, biológicos e, mais comumente, o controle químico, sendo as iscas granuladas a principal estratégia adotada (Marinho et al., 2006). Entre os ingredientes ativos tradicionalmente utilizados no Brasil, destacam-se a sulfluramida e o fipronil (Britto et al., 2016). Em 2023, foi lançado, no Brasil, o isocicloseram, um novo ingrediente ativo pertencente ao grupo químico das isoxazolininas, comercializado pela empresa Syngenta, sob o nome comercial Plinazolin® (MAPA, 2023). O produto, formulado como isca granulada, atua como modulador alostérico dos canais de cloro, controlados pelo neurotransmissor GABA no sistema nervoso central dos insetos, em um sítio de ação distinto dos antagonistas clássicos, como os fipróis e ciclodienos (Zanetti et al., 2024; Reynaga et al., 2013).

O uso de produtos químicos no manejo de pragas tem apresentado crescimento constante nos últimos anos, sendo a maioria desses compostos associada a um elevado potencial de contaminação ambiental (Araújo et al., 2015). Diante desse cenário e considerando a crescente demanda dos consumidores por produtos com menor impacto ambiental e isentos de resíduos contaminantes, torna-se essencial o desenvolvimento de alternativas que representem riscos reduzidos à saúde humana e ao meio ambiente (Araújo et al., 2015). Nesse contexto, estudos com inseticidas botânicos no controle de formigas cortadeiras têm se mostrado promissores, especialmente com o uso de compostos ativos isolados de origem vegetal.

Por exemplo, bioensaios com extratos de *Metrodorea maracasana*, *Conchocarpus mastigophorus*, *Erythroxylum macrocalyx* e *E. plowmanii* demonstraram mortalidade de operárias de *Atta sexdens*, variando entre 90% e 97%, em 21 dias, revelando grande potencial para formulação em iscas tóxicas (Teixeira et al., 2023).

Esses compostos naturais, extraídos principalmente de plantas aromáticas e medicinais, demonstram potencial no manejo de diversas pragas agrícolas. Um exemplo promissor é o timol, um monoterpeno com atividade antimicrobiana comprovada (Dantas et al., 2023), cujo potencial formicida encontra-se em fase de investigação. Estudos já demonstraram sua bioatividade contra outras pragas, como *Sitophilus zeamais* (Memar et al., 2017), indicando seu potencial para o controle de insetos. O modo de ação do timol em insetos está relacionado à sua capacidade de desestabilizar as membranas celulares e interferir no sistema nervoso central, especialmente por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase e da modulação de canais iônicos, levando à paralisação e morte do inseto. Além disso, por possuir uma estrutura química relativamente estável, o timol pode ser sintetizado artificialmente (Lopez e Pascual-Villalobos, 2010), o que amplia suas possibilidades de uso em diferentes formulações. Derivados sintéticos de compostos naturais, como o timol, têm se mostrado eficazes no controle de pragas e, ao mesmo tempo, seletivos a inimigos naturais e polinizadores, contribuindo para sistemas de manejo integrado mais sustentáveis (Costa et al., 2019).

No controle de formigas cortadeiras, há uma crescente necessidade por produtos que sejam eficazes, economicamente viáveis e ambientalmente menos impactantes. Diante disso, torna-se essencial o desenvolvimento de novas pesquisas voltadas à descoberta de moléculas formicidas e fungicidas com ação eficiente tanto sobre as formigas cortadeiras quanto sobre seu fungo simbiote. Este estudo avaliou a ação inseticida de diferentes concentrações de timol (0,01%, 0,1%, 0,3% e 1,0%), por ingestão, às operárias de *Atta laevigata*, bem como sua atividade no fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Material e métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. As operárias de formigas cortadeiras *A. laevigata* utilizadas pertenciam a colônias mantidas no próprio laboratório, sendo selecionadas duas colônias vigorosas para a realização dos experimentos. Consideram-se colônias vigorosas aquelas que apresentam um número elevado de operárias ativas, produção estável de resíduos, presença abundante de fungo simbiote e atividade forrageadora constante. As colônias foram alimentadas com folhas de *Acalypha* sp. (Euphorbiaceae) até o início dos testes. As operárias empregadas nos bioensaios apresentavam massa corpórea variando entre 10 e 20 mg.

O bioensaio seguiu a metodologia descrita por Nagamoto et al. (2004) e a Instrução Normativa nº 36, de 24 de novembro de 2009, do MAPA (BRASIL, 2009). Para a confecção da dieta para incorporação dos tratamentos, utilizou-se polpa cítrica desidratada e moída, misturada a uma solução de sacarose a 10%. Os ingredientes foram combinados com as respectivas concentrações do ingrediente ativo até a obtenção de uma pasta homogênea. A dieta foi acondicionada em recipiente plástico com capacidade de 75 mL,

contendo pedaços de papel-alumínio em seu interior para facilitar a troca da mesma pela esponja fúngica (Figura 1A).



Figura 1 – Dieta confeccionada com polpa cítrica (A), oferta das iscas com os tratamentos às operárias de *Atta laevigata* (B) e colocação da esponja fúngica após a oferta dos tratamentos (C).

Após a confecção da dieta, foi acrescida à mesma as diferentes concentrações a serem testadas do ingrediente ativo timol, com 98,5% de pureza, adquirido da Sigma-Aldrich® (Sigma, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Cajamar, Brasil). As concentrações testadas foram de 0,01%, 0,1%, 0,3% e 1%, além do controle, composto pela formulação isenta do ingrediente ativo. As iscas foram ofertadas às operárias de *A. laevigata* para a avaliação da atividade formicida.

A dieta, contendo cada tratamento, foi ofertada às operárias de *A. laevigata* por um período de 24 horas, sendo utilizada aproximadamente duas gramas por repetição (Figura 1B). Após esse período, a dieta foi retirada e substituída por fragmentos de esponja fúngica, com volume aproximado de 2,0 cm³, contendo cerca de 20 jardineiras (operárias de menor porte), responsáveis pelo cultivo do fungo simbiote *L. gongylophorus*. Considerando a rápida degradação do material fúngico, as esponjas foram substituídas a cada cinco dias, visando manter as condições adequadas para o desenvolvimento e observação do fungo (Figura 1C).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos (quatro concentrações de timol e um controle) e quatro repetições por tratamento, totalizando 20 parcelas experimentais. Cada parcela foi composta por 20 operárias de *A. laevigata*, somando-se 80 indivíduos por tratamento. As avaliações foram realizadas ao longo de 21 dias após a aplicação das dietas tratadas, com observações nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21. Em cada avaliação, foram registrados os índices de mortalidade e sintomas de intoxicação das operárias, conforme metodologia adaptada de Nagamoto et al. (2004).

No bioensaio para avaliação da ação fungicida do timol ao *L. gongylophorus*, foram utilizados os mesmos tratamentos empregados no experimento com operárias de formigas cortadeiras. O fungo foi separado em recipientes plásticos, com capacidade de 250 mL, contendo uma base de gesso para manutenção da umidade. Cada repetição recebeu aproximadamente 75 mL de fungo, coletado de colônias

previamente mantidas em laboratório, preservando-se algumas jardineiras e cortadeiras associadas (Figura 2A). Após a separação, folhas de *Acalypha sp.* foram ofertadas ao fungo, por um período de 48 horas, a fim de garantir sua estabilização antes da aplicação dos tratamentos (Figura 2B).

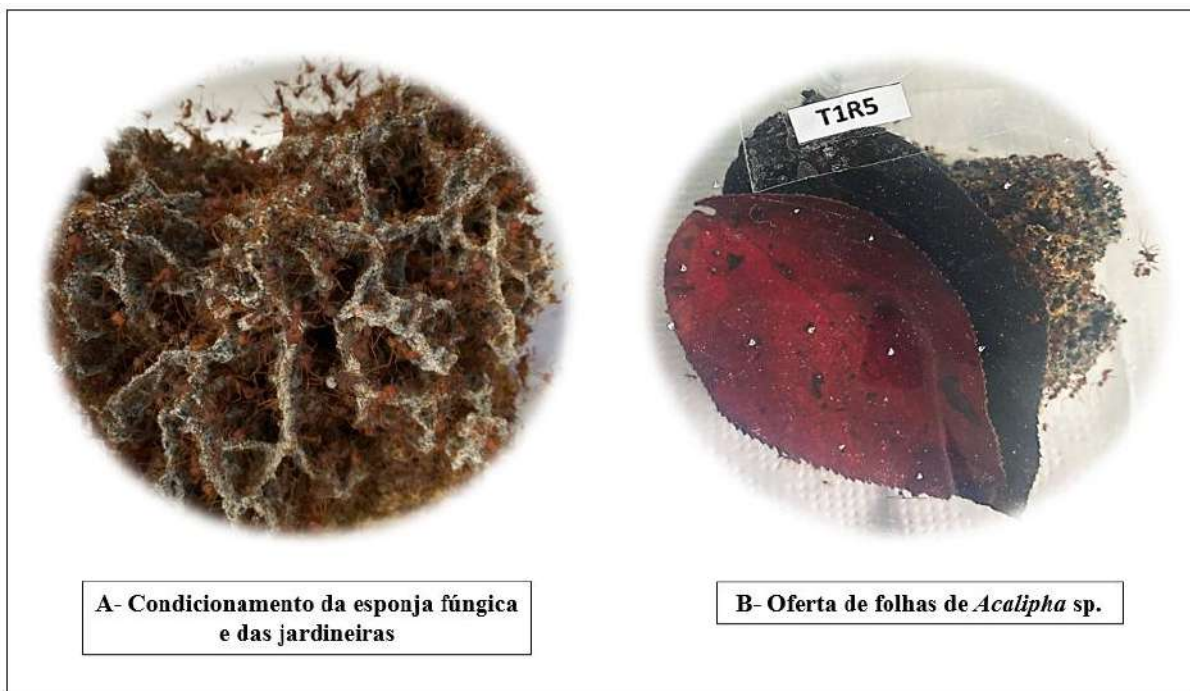


Figura 2 – Detalhe da esponja fúngica, com jardineiras e cortadeiras de *Atta laevigata*, utilizada no bioensaio com *Leucoagaricus gongylophorus* (A) e folhas de *Acalypha sp.* utilizadas na manutenção do fungo simbiote (B).

Os tratamentos, compostos pelas diferentes concentrações de timol e pelo controle (sem adição do ingrediente ativo), foram previamente diluídos em água destilada e acondicionados em frascos tipo borrifador, com capacidade de 50 mL. A aplicação foi realizada por meio de três aspersões uniformes, diretamente sobre o conteúdo dos recipientes experimentais, os quais continham o fungo simbiote *L. gongylophorus* e operárias de *A. laevigata*, assegurando o contato direto da solução com os organismos-alvo. A metodologia foi adaptada de Stefanelli et al. (2021).

Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o comportamento das operárias e a integridade do fungo simbiote *L. gongylophorus*, foi adotado um sistema de classificação baseado em critérios qualitativos e quantitativos. As observações foram realizadas diariamente, ao longo de cinco dias, com base nos parâmetros descritos nas Tabelas 1 a 4. Esses parâmetros incluíram a presença de lixo, o grau de degradação do fungo (Figura 3), a mortalidade das operárias, a incorporação de folhas ao fungo e o padrão de corte foliar (Figura 4).

Tabela 1 - Sistema de avaliação utilizado para análise do lixo produzido retirado pelas operárias de *Atta laevigata*.

Critério Avaliado	Nota	Descrição
Presença de lixo	1	Presente

Presença de lixo	2	Ausente
-------------------------	---	---------

Tabela 2 - Estado de degradação do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

Nota(%)	Descrição
0%	Normal
10%	Pouco degradado
50%	Medianamente degradado
80%	Altamente degradado
100%	Totalmente degradado

Tabela 3 - Mortalidade das operárias de *Atta laevigata* e incorporação de folhas no fungo simbiote.

Nota	Descrição
1	Sim
2	Não

Tabela 4 - Intensidade de corte de folhas pelas operárias de *Atta laevigata*.

Nota	Proporção de Corte	Descrição
1	100%	Corte total
2	80%	Corte intenso
3	50%	Corte moderado
4	33%	Corte parcial
5	16%	Corte reduzido
6	0%	Sem corte

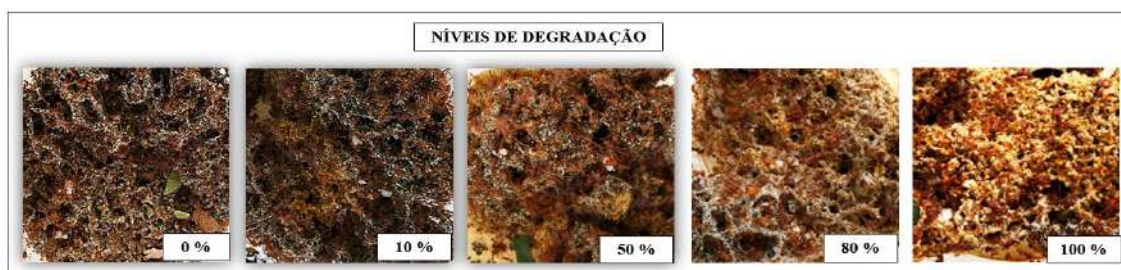


Figura 3 - Detalhe do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* nos diferentes estágios de degradação, de acordo com as notas: 0% - normal, 10% - Pouco degradado, 50% - medianamente degradado, 80% - altamente degradado e 100% - totalmente degradado.

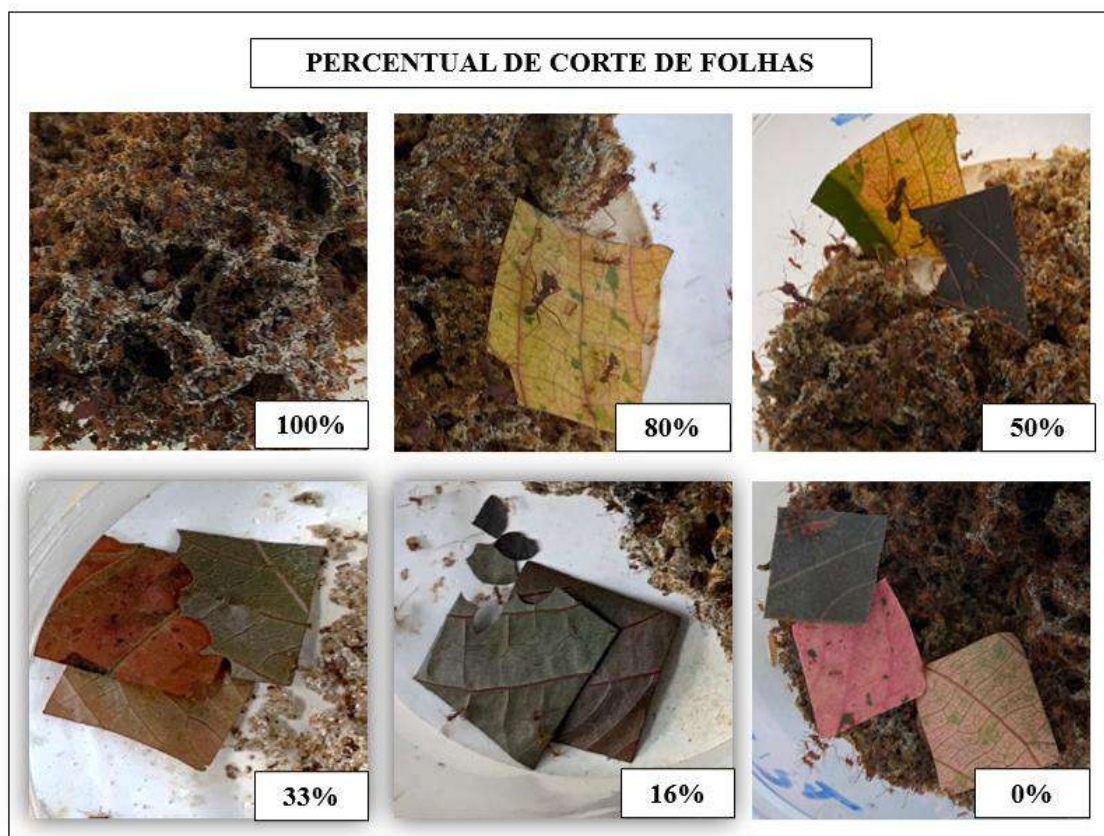


Figura 4 - Detalhes dos cortes de folhas pelas operárias de *Atta laevigata* após a aplicação dos tratamentos com timol no fungo *Leucoagaricus gongylophorus*.

Foi realizado o teste de Log-rank ou Mantel Haenszel para testar a hipótese da inexistência de diferença das funções de sobrevivência entre os tratamentos. Os valores de P foram ajustados pelo método de Benjamini e Hochberg (1995), que controla a taxa de falsa descoberta. Na análise dos dados de sobrevivência das operárias de formigas cortadeiras, utilizou-se o estimador de Kaplan-Meier para a construção das curvas de sobrevivência, conforme descrito por Kaplan e Meier (1958). Para representar graficamente a resposta dos tratamentos ao longo do tempo, foi aplicada a função de mortalidade acumulada. A comparação entre os diferentes tratamentos foi realizada por meio do teste de Log-rank (ou Mantel-Haenszel), com o objetivo de verificar a hipótese nula de igualdade entre as curvas de sobrevivência. Para controle da taxa de erro do tipo I associada a comparações múltiplas, os valores de p obtidos foram ajustados pelo método de Benjamini e Hochberg (1995), que controla a taxa de falsa descoberta (FDR – False Discovery Rate).

No caso das variáveis associadas ao fungo simbiote, foi empregada a análise de regressão logística ordinal, com o objetivo de avaliar a magnitude da relação entre os diferentes tratamentos e os níveis de degradação do fungo, bem como entre os tratamentos e os padrões de corte de folhas.

As análises estatísticas foram conduzidas no ambiente R, versão 4.1.2 (R Core Team, 2020), utilizando os pacotes ggplot2, survival e survminer, em conjunto com o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio, versão 2022.02.3, para a computação estatística e a elaboração dos gráficos.

Resultados

As curvas de sobrevivência das operárias de *A. laevigata*, expostas a diferentes concentrações de timol, revelaram efeitos significativos do composto sobre a mortalidade ao longo do tempo (Figura 5). Os tratamentos T1 (0,01%), T2 (0,1%), T3 (0,3%) e T4 (1,0%) apresentaram redução da probabilidade de sobrevivência já a partir do segundo dia de avaliação, em contraste com o controle (T5), que manteve altos índices de sobrevivência durante todo o período experimental de 21 dias.

Dentre os tratamentos, o T3 (0,3%) destacou-se por provocar mortalidade total até o 17º dia, com probabilidade de sobrevivência igual a zero. Os demais tratamentos com timol mantiveram indivíduos vivos até o 21º dia, mas com probabilidades de sobrevivência consideravelmente reduzidas, todas inferiores a 0,5. O controle, por sua vez, apresentou taxas de sobrevivência superiores a 90% até o final do experimento.

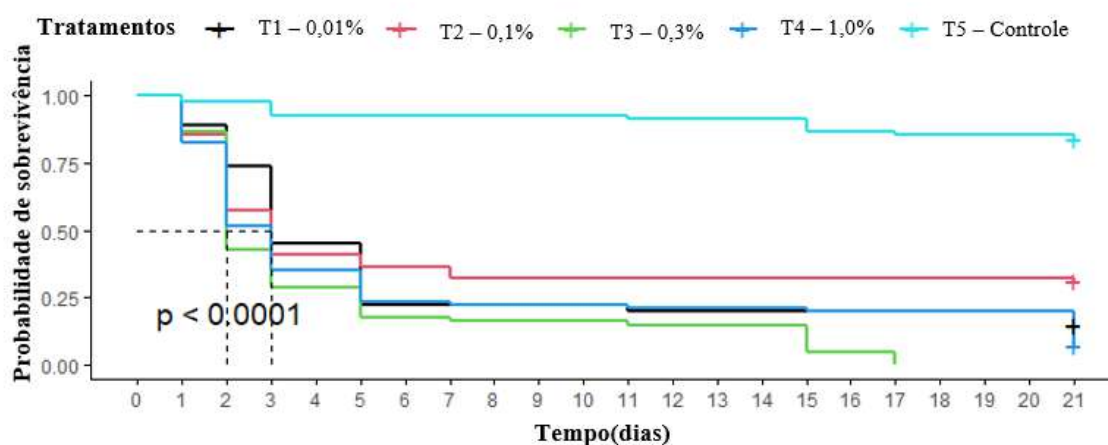


Figura 5 – Curvas de probabilidade de sobrevivência para operárias de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em diferentes concentrações de timol

A análise estatística pelo teste de Log-rank (ou Mantel-Haenszel) confirmou diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência entre os tratamentos. Comparações entre T1 e T2 ($p = 0,34168$), T1 e T4 ($p = 0,09261$) e T2 e T4 ($p = 0,01044$) indicam que T1 não difere significativamente de T2 e T4, embora T2 e T4 apresentem diferença marginal. O tratamento T3 (0,3%) diferiu significativamente de todos os demais ($p < 0,0004$), indicando maior eficácia inseticida (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de p do teste de Log-rank (Mantel-Haenszel) entre os tratamentos com timol na sobrevivência de operárias de *Atta laevigata*.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4
	Timol 0,01%	Timol 0,1%	Timol 0,3%	Timol 1,0%

T2 - Timol 0,1%	0,34168			
T3 - Timol 0,3%	0,00039	8,4e-05		
T4 - Timol 1,0%	0,09261	0,01044	0,02142	
T5 - Controle – sem Timol	< 2e-16	1,5e-12	< 2e-16	< 2e-16

Esses resultados demonstram a atividade inseticida do timol sobre as operárias de *A. laevigata*, com maior efeito observado em T3. Embora T1 (0,01%) tenha causado redução moderada da sobrevivência, sua diferença estatística em relação ao T5 foi altamente significativa ($p < 2e-16$), sugerindo que mesmo em baixas concentrações o timol exerce algum nível de toxicidade.

No bioensaio que avaliou o efeito do timol sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*, as análises não indicaram efeito fungicida nas concentrações testadas. A análise de desviância da variável “fungo degradado” revelou que apenas o fator tempo teve efeito significativo ($\chi^2 = 38,352$; $p < 0,0001$), enquanto o fator tratamento não apresentou significância ($\chi^2 = 0,313$; $p = 0,576$) (Tabela 6). Resultado semelhante foi observado na variável “corte de folhas”, na qual nem o tempo ($p = 0,4205$) nem o tratamento ($p = 0,9765$) influenciaram significativamente o comportamento das operárias (Tabela 7).

Tabela 6 – Análise de Deviância para a variável “fungo degradado” de *Leucoagaricus gongylophorus*.

Razão de verossimilhança	X ²	Gl.	Pr(>X ²)
Tratamentos	0.313	1	0.576
Dia	38.352	1	5.908e-10 ***

Tabela 7 – Análise de Deviância para a variável “corte de folhas” pelas operárias de *Atta laevigata*.

Razão de verossimilhança	X ²	Gl.	Pr(>X ²)
Tratamentos	0,00087	1	0,9765
Dia	0,64903	1	0,4205

Além disso, não foi observada mortalidade significativa das operárias nos potes contendo fungo, mesmo na presença do timol. As operárias continuaram realizando a incorporação das folhas ao fungo, com taxas superiores a 80%, independentemente da concentração testada. Em todos os tratamentos, observou-

se também a retirada ativa de material do lixo, o qual continha porções de fungo degradado, sugerindo a manutenção das práticas de higiene da colônia.

Esses resultados indicam que, embora o timol apresente efeito inseticida evidente sobre operárias isoladas de *A. laevigata*, seu impacto direto sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus* parece ser limitado, possivelmente em decorrência dos comportamentos de defesa e manejo adotados pelas operárias para proteger o cultivo fúngico.

Discussão

Neste estudo, o timol foi testado em diferentes concentrações sobre operárias de *A. laevigata*, revelando efeitos subletais expressivos. O timol, um monoterpeno fenólico presente em plantas das famílias Lamiaceae, Verbenaceae e Ranunculaceae (Naghdi Badi et al., 2017), é conhecido por sua ampla bioatividade, incluindo ações antibacteriana, antifúngica e inseticida, já relatadas por diversos autores (Memar et al., 2017; Melo et al., 2018; Dantas et al., 2023).

A eficácia do timol pode estar relacionada às suas propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas, que influenciam a interação da molécula com sistemas biológicos (Tavares, 2004; Samarasekera et al., 2008). Seu mecanismo de ação também pode envolver a modulação de receptores do sistema nervoso de insetos, como os receptores GABA; ou os octopaminérgicos, específicos de artrópodes, resultando em efeitos neurotóxicos (Pavela & Benelli, 2016; Dantas et al., 2023).

Os resultados do bioensaio de ação de ingestão do timol às operárias de *A. laevigata* indicaram que todas as concentrações de timol testadas impactaram negativamente a sobrevivência das operárias, com reduções significativas nas curvas de sobrevivência. Além da mortalidade direta, observou-se uma série de efeitos comportamentais importantes. Nos primeiros dias de exposição, as formigas demonstraram rejeição às iscas tratadas com timol, além de comportamento agressivo, ambos provavelmente relacionados à ação repelente do composto, já descrita em outras espécies de formigas (Paudel et al., 2023). Essa alteração comportamental pode ser um reflexo da atuação do timol sobre o sistema nervoso, resultando em sintomas como desorientação, lentidão e isolamento social, como relatado por Dantas et al. (2023).

Observações adicionais apontaram uma redução na atividade geral das operárias e no contato com a dieta com os tratamentos, indicando que, mesmo em concentrações menores, o timol pode comprometer o funcionamento da colônia. Esses efeitos foram agravados por comportamentos sociais, como a autolimpeza (*self-grooming*) e o cuidado mútuo (*allogrooming*), que podem tanto limitar quanto propagar a contaminação (Rytter & Shik, 2016). Assim, mesmo com a mortalidade crescente, as formigas demonstraram mecanismos comportamentais que modulam a exposição ao composto, o que reforça a complexidade do controle dessa praga.

No entanto, quando o foco do experimento se voltou para o fungo simbiote *L. gongylophorus*, os resultados foram distintos. Em relação ao fungo, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos contendo timol, indicando ausência de efeito fungicida nas concentrações testadas. Embora o timol já tenha demonstrado atividade antifúngica contra diversos patógenos (Memar et al., 2017; Vaca Toledo et al., 2023), sua ineficácia frente ao fungo simbiote pode ser atribuída às estratégias de defesa comportamentais adotadas pelas formigas.

Durante os experimentos, foi constantemente observada a limpeza ativa do fungo e a remoção do material degradado, comportamentos característicos de insetos eusociais (Wilson, 2000; Camargo et al., 2017). Essas práticas ajudam a evitar a propagação de contaminantes no jardim fúngico e tornam o controle fúngico mais desafiador. Além disso, o fungo simbiote possui mecanismos bioquímicos de defesa, incluindo a produção de enzimas, como a polifenol oxidase (PPO), que atuam na detoxificação de compostos tóxicos (Araújo et al., 2022), reforçando sua resiliência ao timol.

A partir desses resultados, torna-se evidente que o timol apresenta potencial como formicida, principalmente por seus efeitos inseticidas e subletais sobre as operárias. No entanto, seu uso visando a eliminação do fungo simbiote parece limitado nas concentrações testadas, o que exige investigações futuras com doses maiores ou formulações que superem os mecanismos de defesa das formigas.

Importante destacar que o timol é considerado uma substância segura e natural. Classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como aditivo alimentar e geralmente reconhecido como seguro (GRAS), ele possui potencial promissor na formulação de produtos de baixo impacto ambiental (Cohen et al., 2021; Paudel et al., 2023). Nesse contexto, seu uso pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas estratégias de controle sustentável de formigas cortadeiras, aliando eficácia inseticida à segurança ambiental.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o timol possui efeito inseticida eficaz sobre operárias de *A. laevigata*, comprometendo sua sobrevivência e alterando comportamentos essenciais à manutenção da colônia. Apesar de não ter demonstrado ação fungicida significativa sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus* nas concentrações testadas, sua capacidade de afetar diretamente as operárias destaca seu potencial como agente no manejo integrado de formigas cortadeiras. No entanto, devido à complexidade das interações entre formigas e seu fungo simbiote, e aos mecanismos comportamentais de defesa envolvidos, são necessários estudos adicionais para avaliar formulações, concentrações e formas de aplicação que ampliem a eficácia do timol no contexto de colônias estabelecidas em condições de campo.

Declarações e Afirmações

Este trabalho foi apoiado pelas agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, *campus* de Vitória da Conquista; ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia; ao Laboratório de Entomologia do Departamento de Zootecnia/ Fitotecnia, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, em Vitória da Conquista, BA.

Referências

- Araújo MS, Rodrigues CA, Oliveira MA, Jesus FG (2015) Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. *Rev Agric Neotrop* 2(3):8–12
- Araújo S, Seibert J, Ruani A, Alcántara-de la Cruz R, Cruz A, Pereira A et al (2022) The symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae) as a target organism to control leaf-cutting ants. *Insects* 13(4):359
<https://doi.org/10.3390/insects13040359>
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B* 57(1):289–300
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) Instrução Normativa nº 36, de 24 de novembro de 2009. Estabelece diretrizes para experimentação e registro de agrotóxicos, com protocolo para avaliação de iscas formicidas. *Diário Oficial da União*, 27 nov 2009
- Britto JS, Forti LC, Oliveira MA, Zanetti R, Wilcken CF, Zanuncio JC, Loeck AE, Caldato N, Nagamoto NS, Lemes PG, Camargo RS (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int J Res Environ Stud* 3(1):11–92
- Camargo RS, Puccini C, Forti LC, Matos CAO (2017) Behaviors in fungus garden cultivation: Routes of contamination of leaf cutting ant workers with fat-soluble tracer dye. *Int J Agric Innov Res* 5:555–560
- Cohen SM, Eisenbrand G, Fukushima S, Gooderham NJ, Guengerich FP, Hecht SS et al (2021) FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Origanum oil, thyme oil and related phenol derivative-containing flavoring ingredients. *Food Chem Toxicol* 155:112378
- Costa ÂC, Cavalcanti SC, Santana AS, Lima AP, Santana ED, Brito TB et al (2019) Formicidal activity of indole derivatives on *Atta opaciceps* (Borgmeier): Lethal, behavioural and locomotive effects. *J Appl Entomol* 143(1–2):58–68
- Dantas JO, Cavalcanti SC, Araújo APA, Silva JE, Brito TB, Andrade VS et al (2023) Formicidal potential of Thymol derivatives: Adverse effects on the survival and behavior of *Acromyrmex balzani*. *Agriculture* 13(7)
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53(282):457–481
- López MD, Pascual-Villalobos MJ (2010) Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Pest Manag Sci* 66(12):1302–1307
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2023) AGROFIT. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em 23 maio 2025
- Marinho CGS, Della Lucia TMC, Picanço MC (2006) Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola* 7(2):18–21
- Melo CR, Picanço MC, Santos AA, Santos IB, Pimentel MF, Santos AC et al (2018) Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. *Crop Prot* 104:47–51
- Memar MY, Raei P, Alizadeh N, Aghdam MA, Kafil HS (2017) Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Rev Res Med Microbiol* 28(2):63–68
- Nagamoto NS, Forti LC, Andrade APP, Boaretto MAC, Wilcke CF (2004) Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 44(2):413–432
- Naghdi Badi HA, Abdollahi M, Mehrafarin A, Ghorbanpour M, Tolyat SM, Qaderi A, Ghiaci Yekta M (2017) An overview on two valuable natural and bioactive compounds, thymol and carvacrol, in medicinal plants. *J Med Plants* 16:1–32

- Paudel P, Shah FM, Guddeti DK, Ali A, Chen J, Khan IA, Li XC (2023) Repellency of carvacrol, thymol, and their acetates against imported fire ants. *Insects* 14:790
- Pavela R, Benelli G (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci* 21(12):1000–1007
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>. Acessado em 23 maio 2025
- Reynaga PG, Zhao C, Sarpong R, Casida JE (2013) New GABA/glutamate receptor target for [3H] isoxazoline insecticide. *Chem Res Toxicol* 26(4):514–516
<https://doi.org/10.1021/tx400055p>
- Rytter W, Shik JZ (2016) Liquid foraging behavior in leaf-cutting ants: The lunchbox hypothesis. *Behav Ecol Sociobiol* 70(3):483–492
<https://doi.org/10.1007/s00265-016-2066-2>
- Samarasekera R, Weerasinghe IS, Hemalal KP (2008) Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. *Pest Manag Sci* 64:290–295
<https://doi.org/10.1002/ps.1516>
- Souza A, Zanetti R, Calegario N (2011) Nível de dano econômico para formigas-cortadeiras em função do índice de produtividade florestal de eucaliptais em uma região de Mata Atlântica. *Neotrop Entomol* 40:483–488
- Souza MD, Peres Filho O, Dorval A (2011) Effect of natural extracts of vegetable leaves in *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales: Agaricaceae). *Ambiência* 7(3):461–471
- Stefanelli LEP, Mota Filho TMM, Camargo RS, Matos CAO, Forti LC (2021) Effects of entomopathogenic fungi on individuals as well as groups of workers and immatures of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Insects* 12(1):10
<https://doi.org/10.3390/insects12010010>
- Tavares LC (2004) QSAR: a abordagem de Hansch. *Quim Nova* 27:631–639
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400018>
- Teixeira FV, Souza TRM, Castellani MA, Camargo RS, Forti LC, Paula VF, Sabattini JA (2023) Bioatividade de extratos vegetais contra operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) por ingestão. *Int J Trop Insect Sci* 4:1227–1236
<https://doi.org/10.1007/s42690-023-01030-6>
- Vaca Toledo D, Santana Cruz A, Guerra Gonzales R, Flores Moreno JL, López Bucio JS, Reyes de la Cruz H, Vázquez Fuentes S (2023) Nanomaterial híbrido como bio-fungicida para el sector agrícola. *Mundo Nano* 16(30):e00058
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69736>
- Wilson EO (2000) *Sociobiology: The new synthesis*. Harvard University Press, Cambridge
- Zanetti R, Sanches JJ, Wenzel AVA, Haddi K, Ferreira H, Santos LV (2024) Isocloseram: Um novo princípio ativo para controle de formigas cortadeiras. *PLoS ONE* 19(5):e0300187 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300187>

ARTIGO 3

**TOXICIDADE DA ROTENONA A OPERÁRIAS DE *Atta laevigata*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

***Situação:** Em submissão

TOXICIDADE DA ROTENONA A OPERÁRIAS DE *Atta laevigata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Talytha Ravenna de Melo Souza^{1*}, Maria Aparecida Castellani¹, Luiz Carlos Forti², Roberto da Silva Camargo², Carlos Alberto Oliveira de Matos³, Juliane Pereira Portugal¹, Aldenise Alves Moreira¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista, BA, Brasil. E-mail: talyraven19@gmail.com; castellani@uesb.edu.br; ellenrainha0@gmail.com; a.moreira@uesb.edu.br

² Laboratório de Insetos Sociais-Pragas, Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, FCA, Caixa Postal 237, 18603-970. E-mail: camargosauva@gmail.com

³ Instituto de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), *Campus* de Itapeva, Itapeva, Brasil. E-mail: carlos.matos@unesp.br

*Autor Correspondente: Talytha Ravenna de Melo Souza, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Estrada do Bem Querer, Km 04, Caixa

Resumo

As formigas cortadeiras causam grandes prejuízos em plantações agrícolas, florestais e pastagens, especialmente em áreas recém-implantadas, motivando pesquisas por alternativas ao controle químico tradicional, a fim de minimizar os impactos ao ambiente e à saúde humana. Este estudo avaliou a atividade inseticida da rotenona sobre operárias de *Atta laevigata* por ingestão, em condições de laboratório. Foram testadas as concentrações de 0,01%, 0,1%, 0,3% e 1% de rotenona, além de um controle sem ingrediente ativo. A mortalidade das operárias foi registrada ao longo de 21 dias após a exposição às dietas tratadas. As curvas de sobrevivência demonstraram que as operárias expostas à rotenona apresentaram redução progressiva da probabilidade de sobrevivência em todos os tratamentos. A concentração de 0,01% resultou em mais de 50% de mortalidade após 17 dias de exposição. Esses resultados indicam um efeito retardado da rotenona sobre operárias de *A. laevigata*, representando uma característica eficaz para o controle, o que reforça a necessidade de novos estudos em colônias de laboratório e campo.

Palavras-chave: Mortalidade; formigas cortadeiras; controle químico; ingestão; isca tóxica.

Abstract

Leaf-cutting ants cause significant damage to agricultural crops, forest plantations, and pastures, especially in newly established areas, prompting research into alternatives to conventional chemical control in order to reduce environmental and human health impacts. This study evaluated the insecticidal activity of rotenone on *Atta laevigata* workers through ingestion under laboratory conditions. Concentrations of 0.01%, 0.1%, 0.3%, and 1% rotenone were tested, along with a control treatment without the active ingredient. Worker mortality was recorded over a 21-day period following exposure to the treated diets. Survival curves showed that workers exposed to rotenone exhibited a progressive reduction in survival probability across all treatments. The 0.01% concentration resulted in over 50% mortality by the 17th day of exposure. These results indicate a toxic effect of rotenone at low concentrations on *A. laevigata* workers, representing a promising characteristic for further studies on its use in the formulation of toxic baits.

Keywords: Mortality; leaf-cutting ants; chemical control; ingestion; toxic bait.

1. Introdução

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), conhecidas pelo hábito polígrafo de utilizar diferentes espécies vegetais para o cultivo do fungo simbiote, figuram entre as principais pragas de importância econômica em diversos cultivos agrícolas e florestais, especialmente durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas [1]. Nessas etapas mais vulneráveis, esses insetos podem promover desfolhas severas, afetando culturas como eucalipto, manga e laranja, comprometendo o crescimento das mudas e, em casos extremos, ocasionando a perda total da área implantada. Em cultivos comerciais de eucalipto na região da Mata Atlântica, por exemplo, verificou-se que um aumento de apenas $1 \text{ m}^2/\text{ha}^{-1}$ na densidade de ninhos de *Atta* pode reduzir em até $0,13 \text{ m}^3/\text{ha}^{-1}$ a produção de madeira, evidenciando prejuízos econômicos significativos, sobretudo em áreas de florestamento jovem [2].

O controle de formigas cortadeiras é, portanto, fundamental em áreas agrícolas e florestais afetadas. Entre os métodos disponíveis, o uso de iscas formicidas granulados é a estratégia mais eficaz e amplamente utilizada, contendo geralmente sulfluramida (0,3%) ou fipronil (0,003%) como ingrediente ativo [3]. O fipronil apresenta ação rápida, interferindo em comportamentos essenciais, como *allogrooming* e manejo do lixo fúngico, resultando na degradação do fungo simbiote e morte da colônia [4, 5], mas sua toxicidade imediata pode limitar a dispersão do inseticida dentro da colônia. Já a sulfluramida, de ação mais lenta, permite maior distribuição entre os indivíduos antes da

manifestação dos sintomas, favorecendo o colapso gradual da colônia e da atividade fúngica [3].

Apesar da eficácia, essas substâncias apresentam alta persistência ambiental e riscos a organismos não alvo, o que tem impulsionado a busca por alternativas sustentáveis [5]. Entre as opções promissoras, destacam-se substâncias de origem natural, como a rotenona, extraída de plantas dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus* [5]. Este ingrediente ativo apresenta baixa toxicidade a mamíferos, rápida degradação ambiental e ação inseticida por ingestão e contato [6, 7]. Seu mecanismo de ação consiste na inibição do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, bloqueando a síntese de ATP e induzindo acúmulo de ROS, levando à morte celular [8, 9].

A rotenona pode ser utilizada na agricultura orgânica, sendo permitida apenas sob regulamentações específicas desde que aprovadas por autoridades certificadoras na agricultura orgânica [10,11]. Estudos já demonstraram sua toxicidade contra diversas pragas, incluindo *Atta sexdens rubropilosa* [12], *Cerotoma arcuatus* [13] e *Anastrepha fraterculus* [14]. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade inseticida da rotenona sobre operárias de *Atta laevigata* por ingestão, em condições de laboratório.

2. Material e Métodos

O bioensaio foi conduzido no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizado no município de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

Foram utilizadas operárias da espécie *A. laevigata* (Fr. Smith, 1858), provenientes de colônias mantidas em laboratório, alimentadas com folhas de *Acalypha* sp., utilizadas como substrato vegetal para o cultivo do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller.

O ingrediente ativo rotenona foi adquirido junto à empresa Sigma-Aldrich® (Millipore, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Cajamar, Brasil). O produto apresenta grau analítico com pureza $\geq 95\%$ e foi empregado como ingrediente ativo para avaliação da ação tóxica por ingestão.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições, totalizando 25 unidades experimentais. Os tratamentos consistiram da dieta com as concentrações do ingrediente ativo rotenona em quatro concentrações distintas: 0,01% (T1), 0,1% (T2), 0,3% (T3) e 1% (T4). O

tratamento T5 correspondeu ao controle, sem adição do ingrediente ativo. Essa estrutura experimental permitiu a avaliação dos efeitos da rotenona sobre a sobrevivência das operárias de *A. laevigata*, por meio de ingestão, em diferentes níveis de exposição a substância.

O presente estudo seguiu o protocolo proposto por Nagamoto et al. (15) e padronizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (16), o qual estabelece a formulação de uma isca artificial à base de polpa cítrica desidratada e moída, incorporada a uma solução aquosa de sacarose a 10%. Essa mistura, incorporada dos tratamentos com o ingrediente ativo rotenona, resultou em uma pasta homogênea.

As parcelas foram constituídas de recipientes plásticos transparentes de 250 mL de capacidade, contendo uma camada de gesso com aproximadamente um centímetro de espessura (para conservar a umidade da esponja fúngica), seco naturalmente antes do início da execução do bioensaio.

Após a preparação dos recipientes com a base de gesso, procedeu-se a introdução das operárias de *A. laevigata* e as dietas. Em cada recipiente, foram inseridas 20 operárias, selecionadas com base na massa corpórea entre 10 e 20 mg. As dietas contendo os respectivos tratamentos foram oferecidas sobre um pequeno pedaço de papel alumínio, colocado na superfície do recipiente (Figuras 1A), totalizando 100 operárias por tratamento.

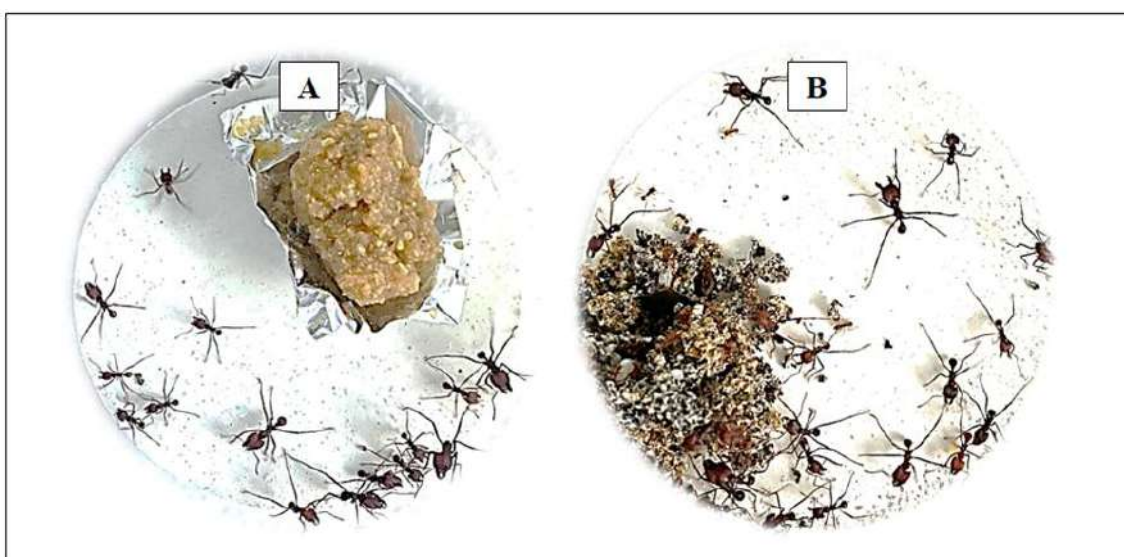


Figura 1. Exposição das operárias de *A. laevigata* à isca (A) e oferta da esponja fúngica para as operárias, após a retirada da dieta com os tratamentos (B).

A dieta contendo os respectivos tratamentos foi disponibilizada às operárias por um período de 24 horas. Após esse intervalo, a dieta foi cuidadosamente removida, e cada recipiente recebeu aproximadamente 2,0 cm³ de esponja fúngica, contendo cerca de 20 jardineiras — operárias de menor porte, responsáveis por funções essenciais no cultivo e manutenção do fungo mutualístico *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Figuras 1B).

A avaliação da mortalidade das formigas foi realizada através da mortalidade acumulada ao longo do tempo, nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17 e 21 após a aplicação dos tratamentos. Esse protocolo seguiu a metodologia descrita por Nagamoto et al. [17].

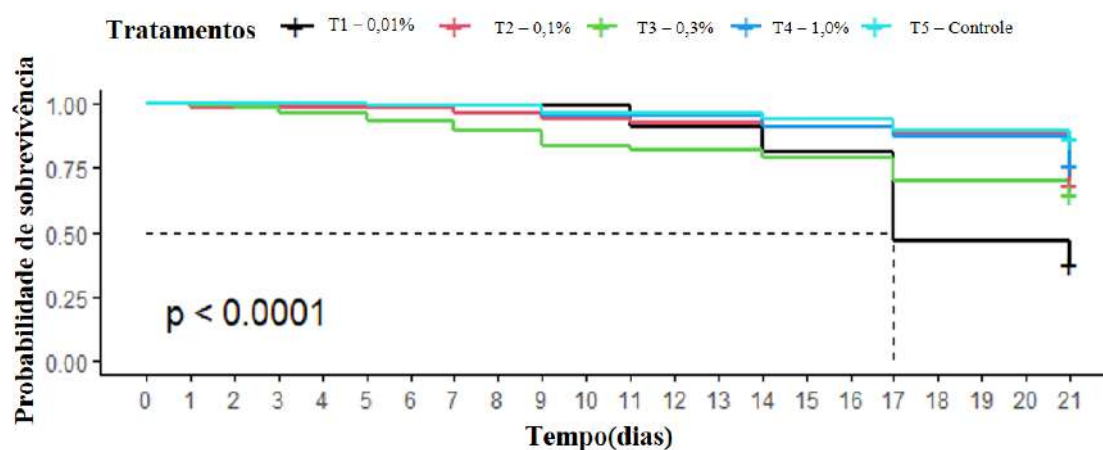
A análise estatística foi realizada com base nos dados de mortalidade acumulada diária das formigas operárias, considerando sua variação ao longo do tempo. Para estimar a função de sobrevivência dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos, foi empregado o estimador de Kaplan-Meier [13]. A comparação entre as curvas de sobrevivência foi realizada por meio do teste de Log-rank (ou Mantel-Haenszel), a fim de verificar a existência de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Os valores de *P* foram ajustados pelo método de Benjamini e Hochberg [18], que controla a taxa de descoberta falsa (FDR).

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas no ambiente estatístico R, versão 4.1.2 [19], com o auxílio do ambiente de desenvolvimento integrado RStudio 2022.02.3. Foram empregados os pacotes *ggplot2*, *survival* e *survminer* para a computação estatística, visualização dos dados e interpretação gráfica dos resultados.

3. Resultados

As curvas de probabilidade de sobrevivência evidenciaram o impacto negativo do ingrediente ativo rotenona nas operárias da espécie *A. laevigata*. Este estudo demonstrou que, após 17 dias de avaliação, a administração de 0,01% de rotenona resultou em uma taxa de sobrevivência abaixo de 50%, indicando uma redução da probabilidade de sobrevivência para as operárias submetidas a essa concentração, durante o período das avaliações (Figura 2). Esses resultados ressaltam a toxicidade da rotenona nessa concentração.

Figura 2. Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) submetidas a diferentes concentrações de rotenona (0,01%, 0,1%, 0,3%, 1,0%) e ao tratamento controle (sem rotenona), ao longo de 21 dias de avaliação.



As curvas de sobrevivência demonstraram o efeito tóxico da rotenona sobre operárias de *A. laevigata*, com redução significativa na probabilidade de sobrevivência nos tratamentos contendo o ingrediente ativo (Figura 2). A concentração de 0,01% foi a única a apresentar uma taxa de sobrevivência inferior a 50%, após 17 dias, evidenciando sua eficácia no controle das operárias ao longo do tempo.

De modo geral, as operárias expostas às dietas com rotenona apresentaram alta sobrevivência durante os 21 dias de avaliação, com taxas acima de 50% em todos os tratamentos, exceto na concentração de 0,01% (Figura 2).

A análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1). A concentração de 0,01% diferiu-se estatisticamente de todos os demais, indicando maior mortalidade acumulada. O tratamento controle, sem rotenona, diferiu-se significativamente de todos os demais, com exceção da concentração de 1%, refletindo a baixa mortalidade observada nesse tratamento. Esses dados reforçam a ação retardada da rotenona, com efeito cumulativo ao longo do tempo.

Tabela 1. Valores da análise de sobrevivência para operárias de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em função dos tratamentos.

Tratamentos	T1 - 0,01%	T2 - 0,1%	T3 - 0,3%	T4 - 1,0%
T2				
Rotenona 0,1%	7.1e-06			
T3				
Rotenona 0,3%	0.00521	0.30693		
T4				
Rotenona 1,0%	2.4e-07	0.31742	0.06272	
T5				
Controle: sem Rotenona	3.3e-11	0.00677	0.00048	0.07093

A concentração de 0,01% destacou-se como a mais promissora. Apesar de promover mortalidade de forma mais lenta, ultrapassou 50% de mortalidade ao final de 17 dias de exposição. Essa característica de ação retardada é desejável para uso em iscas tóxicas no manejo de formigas cortadeiras, pois favorece a disseminação do ingrediente ativo entre as operárias.

4. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo confirmam o potencial inseticida da rotenona contra operárias de *A. laevigata*, especialmente na concentração de 0,01%, que provocou mortalidade superior a 50%, após 17 dias de avaliação. Essa eficácia está diretamente relacionada ao seu mecanismo de ação, pois a rotenona atua como um potente inibidor do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Essa inibição interrompe a transferência de elétrons dos centros de ferro-enzofre para a ubiquinona, bloqueando a fosforilação oxidativa e limitando a síntese de ATP [20]. Como consequência, há uma redução das taxas respiratória e cardíaca dos organismos expostos [21,22,23].

Em insetos, os efeitos da rotenona se manifestam por meio da paralisação da alimentação, perda das funções motoras, paralisia e, eventualmente, morte, que pode ocorrer em algumas horas ou dias após a exposição, dependendo da dose e da via de ação [24]. No presente estudo, a mortalidade se desenvolveu de forma progressiva, característica compatível com a ação mais lenta da rotenona em comparação a outros inseticidas botânicos. Essa ação retardada é, inclusive, desejável em formulações de iscas

tóxicas voltadas para o controle de formigas cortadeiras, uma vez que permite o transporte da substância até o interior do ninho, afetando outras castas da colônia.

A rotenona é um composto de origem vegetal que apresenta ação inseticida, tanto por ingestão quanto por contato, sendo capaz de penetrar no organismo dos insetos através do canal alimentar, das traqueias e do tegumento [21]. Essa versatilidade na via de absorção pode ter favorecido a contaminação das operárias de *A. laevigata* ao entrarem em contato direto com a dieta contendo o ingrediente ativo.

Durante o experimento, foi observada uma movimentação intensa das operárias ao redor da dieta tratada, especialmente nas primeiras horas de exposição. Esse comportamento sugere que a interação direta com o alimento contaminado foi determinante para a absorção da substância, o que se refletiu nos níveis de mortalidade observados, principalmente na menor concentração testada (0,01%). Resultados semelhantes foram relatados por Nirma et al. [24], que destacam a eficiência da rotenona mesmo em concentrações menores, especialmente em situações de exposição prolongada e contato direto com o substrato tratado.

Na concentração de 0,01% de rotenona, a mortalidade das operárias ocorreu mais rapidamente em comparação às concentrações superiores, possivelmente devido à maior palatabilidade e aceitação da dieta contendo o ingrediente ativo. Por outro lado, as concentrações mais elevadas podem ter exercido efeito deterrente, reduzindo o contato e o consumo pelas operárias, o que conseqüentemente limitou o grau de intoxicação. Esse tipo de resposta comportamental já foi observado por Fazolin, Estrela e Argolo [25], ao avaliarem extratos de *Derris urucu* a 13%, os quais apresentaram efeito deterrente sobre *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae).

O efeito inseticida da rotenona obtido neste estudo também foi observado em operárias de *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) após exposição tópica [26]. Da mesma forma, Efrom et al. [14] relataram uma mortalidade de 71,6% em *Anastrepha fraterculus* Wiedemann, 1830 (Diptera: Tephritidae), tanto por contato quanto por ingestão, sendo que, de modo geral, a rotenona apresenta atividade inseticida [27].

Esses resultados reforçam a ampla eficácia do composto em diferentes insetos. Um dos fatores pode estar relacionado ao modo como o inseto interage com a substância, por contato direto, ingestão ou exposição prolongada, podendo influenciar significativamente os níveis de toxicidade observados [20]. No caso das formigas cortadeiras, a interação intensa com a dieta contendo rotenona sugere uma via de

contaminação eficaz, o que justifica os efeitos retardados observados, mesmo em baixas concentrações.

A utilização de inseticidas botânicos com eficiência comprovada é importante como alternativa no controle de pragas [27]. A rotenona, apesar de sua rápida degradação [28], demonstrou ser uma substância com efeito subletal desejável, no controle de formigas cortadeiras, e no presente estudo uma eficiência acima de 50% com uma baixa concentração de 0,01 %, sendo uma importante característica na formulação de isca tóxica.

Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pelas Agências de Fomentos Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES] e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia [FAPESB] número da bolsa [BOL0056/2022] nesta seção.

Agradecimentos

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Vitória da Conquista; ao Laboratório de Entomologia da UESB; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflito de interesses

Os autores não têm interesses financeiros ou não financeiros relevantes a declarar.

Contribuições dos autores

O manuscrito foi criado, elaborado e escrito por A. A. M., M. A. C., L. C.F. T.R.M.S. e R.S.C. O material, a preparação e a coleta de dados foram realizadas por T.R.M.S., E. R. S., A. A.M. e R. C. A. L. P. As análises foram realizadas por C. A. O. M., R. S. C. e J. A. S. O manuscrito foi revisado e editado por T.R.M.S., A.A.M., J.A.S., R.C.A.L.P., C.A.O.M. e L.C.F. Todos os autores contribuíram na revisão, edição do artigo e aprovaram o manuscrito final.

Referências Bibliográficas

1. Scherf, A. N.; Corley, J. C.; Gioia, C. D.; Eskiviski, E. R.; Carazzo, C.; Patzer, H. R.; Dimarco, R. D. Impact of a leaf-cutting ant (*Atta sexdens* L.) on a *Pinus taeda* plantation: A 6 year-long study. *J. Appl. Entomol.* **2022**, *146* (9), 1178–1184. <https://doi.org/10.1111/jen.13047>
2. Souza, A.; Zanetti, R.; Calegario, N. Economic damage level for leaf-cutting ants in function of the productivity index of *Eucalyptus* plantations in an Atlantic Forest region. *Neotrop. Entomol.* **2011**, *40* (4), 483–488. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000400012>
3. Sabattini, J. A.; Zanoncio, J. C.; Camargo, R. S.; Forti, L. C. Action mode of fipronil and sulfluramid in baits on *Acromyrmex crassispinus* in laboratory conditions. *BioAssay* **2018**. <https://doi.org/10.37486/1809-8460.ba18004>
4. Gandra, L. C.; Amaral, K. D.; Couceiro, J. C.; Della Lucia, T. M.; Guedes, R. N. C. Mechanism of leaf cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Manag. Sci.* **2016**, *72* (1), 112–119.
5. Mota Filho, T. M. M.; Camargo, R. S.; Zanoncio, J. C.; Stefanelli, L. E. P.; Matos, C. A. O.; Forti, L. C. Contamination routes and mortality of *Atta sexdens* by fipronil and sulfluramid through social interactions. *Pest Manag. Sci.* **2021**, *77* (10), 4411–4417.
6. Gonçalves Spletozer, A.; Santos, C. R.; Sanches, L. A.; Garlet, J. Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. *Cienc. Florest.* **2021**, *31* (2).
7. Ghosh, S.; Das, S.; Saha, S. Rotenone: A Botanical Insecticide for Organic Agriculture. *Res. Rev. J. Toxicol.* **2023**, *13* (2), 1–6.
8. Singer, T. P.; Ramsay, R. R. The reaction site of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, pp 198–202.
9. Sun, Z.; Xue, L.; Li, Y.; Cui, G.; Sun, R.; Hu, M.; Zhong, G. Rotenone-induced necrosis in insect cells via cytoplasmic membrane damage and mitochondrial dysfunction. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2021**, *173*, 104801. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104801>
10. OMRI. *OMRI Generic Materials List*; OMRI: Eugene, OR, USA, **2004**. Disponível online: https://www.omri.org/sites/default/files/opl_pdf/OMRI_Generic_Materials_List.pdf (acessado em 14 jul 2025).
11. FAO. *Guidelines for the Production, Processing, Labeling and Marketing of Organically Produced Foods*; FAO: Rome, Italy, **2001** (GL 32-1999). Disponível online: <https://www.fao.org/4/Y2772E/y2772e0c.htm> (acessado em 14 jul 2025).
12. Bueno, O. C.; et al. Utilização de alimentos pelas formigas cortadeiras. In *Insetos Sociais: da biologia à aplicação*; Vilela, E. F.; et al., Eds.; UFV: Viçosa, MG, Brasil, **2008**; Cap. 6, pp 96–114.
13. Alecio, M. R.; Fazolin, M.; Netto, R. A. C.; Catani, V.; Estrela, J. L. V.; Alves, S. B.; Correa, R. S.; Andrade Neto, R. C.; Gonzaga, A. D. Ação inseticida do extrato de *Derris amazonica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera:

Chrysomelidae). *Acta Amazon.* **2010**, 40 (4), 719–728.
<https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000400012>

14. Efrom, C. F. S.; Redaeli, L. R.; Meirelles, R. N.; Ourique, C. B. Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American Fruit Fly, *Anastrepha fraterculus* in organic farming. *Crop Prot.* **2011**, 30 (1), 1162–1167.
15. 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* **2004**, 44 (2), 413–432.
16. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 5 dez, Seção 1, p. 4–5, **2011**.
17. Kaplan, E. L.; Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **1958**, 53 (282), 457–481. <https://doi.org/10.2307/2281868>
18. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc., Ser. B* **1995**, 57 (1), 289–300.
19. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, **2021**. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.
20. Heinz, S.; Freyberger, A.; Lawrenz, B.; Schladt, L.; Schmuck, G.; Ellinger-Ziegelbauer, H. Mechanistic investigations of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 45465.
21. Matsumura, F. Modes of action of insecticides. In *Toxicology of Insecticides*; Springer: Boston, MA, USA, **1975**; pp 105–163.
22. Gallo, L. G.; Allee, L. L.; Gibson, D. M. Insecticidal effectiveness of *Mammea americana* (Guttiferae) extracts on larvae of *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Econ. Bot.* **2002**, 50 (2), 236–242.
23. Tada-Oikawa, S.; Hiraku, Y.; Kawanishi, M.; Kawanishi, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci.* **2003**, 73 (1), 3277–3288.
24. Nirma, C.; Rodrigues, A. M.; Basset, C.; Chevolut, L.; Girod, R.; Moretti, C.; Stien, D.; Dusfour, I.; Eparvier, V. Larvicidal activity of isoflavonoids from *Muelleria frutescens* extracts against *Aedes aegypti*. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, 7 (10), 1319–1322.
25. Fazolin, M.; Estrela, J. L. V.; Argolo, V. Avaliação de plantas com potencial inseticida no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Cerotoma tingomarianus* Bechyné). *Embrapa Acre: Rio Branco, Brasil*, **2002**; 42 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).
26. Hebling-Beraldo, M. J.; Vicelli-Zanão, R. C. Toxicidade de nicotina e rotenona e efeitos respiratórios em *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) e *Atta sexdens rubropilosa*

- Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* **1986**, 15 (2), 219–229.
27. Xu, D.; Zhou, Y.; Lin, L.; Zhang, Z.; Zhang, J.; Lu, S.; Yang, F.; Huang, P. Determination of rotenone residues in foodstuffs by solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Agric. Sci. China* **2010**, 9, 1299–1308.
28. Upadhyay, R. K. Plant natural products: their pharmaceutical, nutraceutical and antimicrobial potential. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2016**, 5 (4), 63–79.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados com os compostos oximatrine, timol e rotenona demonstraram eficácia inseticida no controle de operárias de formigas cortadeiras em condições de laboratório. No entanto, não foi observada a inibição do fungo *L. gongylophorus* com o uso do timol.

Esses resultados fornecem subsídios importantes para pesquisas futuras envolvendo esses ingredientes ativos, visando seu potencial uso em formulação de isca tóxica. A continuidade dos estudos é essencial para avaliar não apenas a eficácia no controle das formigas, mas também a viabilidade prática de aplicação desses compostos em colônias de laboratório e campo. A formulação de produtos fitossanitários requer a consideração de diversos fatores, como estabilidade, segurança toxicológica, seletividade e impacto ambiental, sendo fundamental integrar essas variáveis no desenvolvimento de alternativas eficazes ao controle químico convencional.