Carlos Henrique Miyashira

Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista.

São Paulo
2007

Carlos Henrique Miyashira

Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientadora: Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Miyashira, Carlos H.
Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista.
61 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Atta sexdens 2. Cafeína 3. Fungo mutualista I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr.(a). Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

Orientador(a)

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente a meus pais, Regina e Luiz Miyashira, às minhas irmãs, Flávia e Gisele, e à minha namorada, Carol.

Agradecimentos

Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos, pela orientação, amizade e paciência durante todos estes anos, e por ter me apresentado ao mundo das saúvas.

Dra Adriana de Mello Gugliotta, pela co-orientação e acolhimento no Instituto de Botânica, e por todas as sugestões e idéias, que permitiram a realização do trabalho com o fungo.

Prof Dr Antônio Salatino e Profa Dra Maria Luiza Faria Salatino, por suas críticas, idéias e sugestões, e pelo conhecimento adquirido durante todos esses anos.

Daniel, por ter dividido comigo os cuidados dos sauveiros, por todas as sugestões, críticas e discussões, muito valiosas para este trabalho, e pela amizade durante todos esses anos.

Mayumi, pela grande amizade desde o início da graduação e pelo companheirismo tanto dentro quanto fora do laboratório.

Pedro, por sua ajuda nos momentos em que os sauveiros estavam com problemas, e pelos conhecimentos fornecidos.

André Eterovic, por sua disponibilidade para discussão e por seu auxílio no desenvolvimento do trabalho, de acordo com as regras de estatística.

Sr Luís Ramalho, pela disponibilidade e auxílio para as coletas anuais de sauveiros.

A todos do Laboratório de Fitoquímica (USP), pela convivência, amizade, e por todos os momentos pelos quais nos reunimos.

Ao pessoal do Departamento de Micologia e Liquenologia (IBt), pelo auxílio nos momentos de dúvida e paciência pela desordem causada.

Aos novos colegas da URDIP (FMABC), pela amizade, convivência e compreensão.

A toda a minha família, por ter grande responsabilidade na minha formação, tanto profissional quanto pessoal, por seu incentivo, convivência e amizade.

A minha querida Carol, por sua ajuda em alguns experimentos e em alguns cuidados dos sauveiros, por toda sua paciência e compreensão, e por todo seu amor e carinho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Índice

Dedicatória III
Agradecimentos IV
1. Introdução
1.1. As formigas cortadeiras 1
1.1.1. Os sauveiros 4
1.1.2. Anatomia 5
1.1.3. Desenvolvimento 7
1.1.4. Forrageamento 8
1.1.5. Cultivo do fungo e alimentação 9
1.1.6. Defesas contra outros organismos 11
1.1.7. Formação de novas colônias 13
1.1.8. Impacto ecológico e econômico 16
1.1.9. Combate 17
1.2. Cafeína 19
1.2.1. Mecanismos de ação em seres humanos 20
1.2.2. Ação em outros seres vivos 22
2. Objetivos 24
3. Material e Métodos
3.1. Sauveiros 25
3.2. Isolamento do fungo e preparo da cultura inicial *in vitro* 26
3.3. Seleção do meio de cultura para o ensaio de toxicidade 26
3.4. Influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo mutualista 28
3.5. Influência da cafeína na sobrevivência das formigas 29
4. Resultados e Discussão
4.1. Coleta e manutenção dos sauveiros 30
4.2. Isolamento e manutenção do fungo 32
4.3. Seleção do meio de cultura 36
4.4. Influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo mutualista 39
4.5. Influência da cafeína na sobrevivência das saúvas 43
5. Conclusões 48
5.1. Possível utilização da cafeína para o combate de formigas cortadeiras 48
Resumo 50
Abstract 51
Referências Bibliográficas 52

1. INTRODUÇÃO

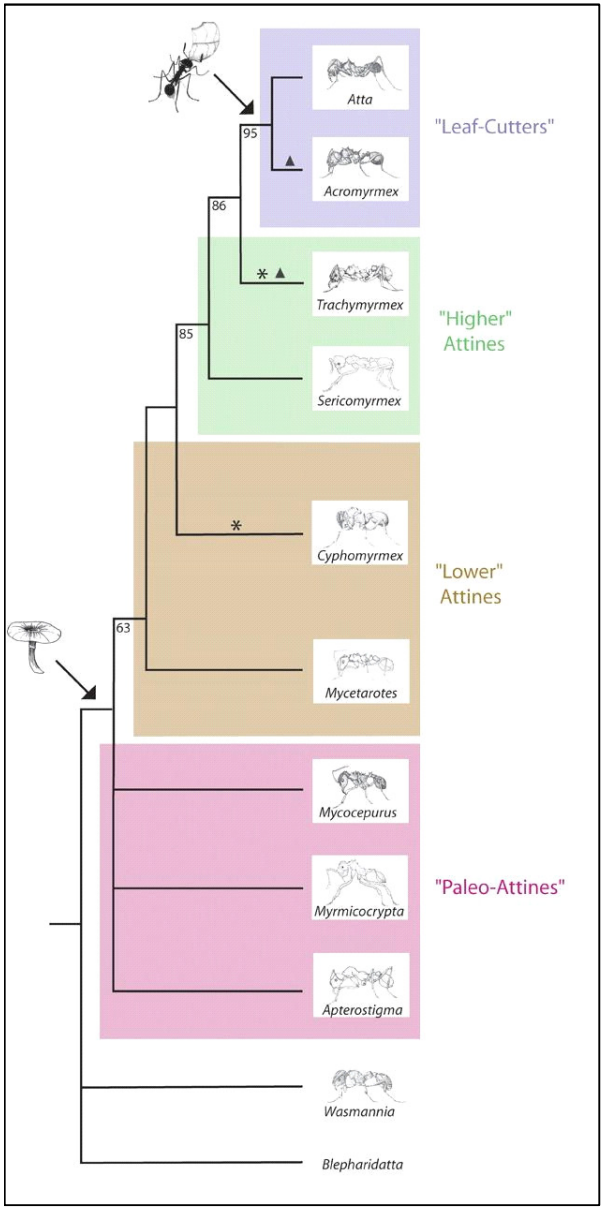
1.1. As formigas cortadeiras

As formigas são insetos com hábitos eusociais, pois apresentam sobreposição de duas ou mais gerações, comportamento de cuidado com a prole e diferentes castas (reprodutivas e não reprodutivas). Essa convivência em sociedade permitiu a esses insetos alcançar um grande sucesso de vida (Oster & Wilson, 1978; Hölldobler & Wilson, 1990; Ruppert & Barnes, 1996).

As formigas são classificadas como uma única família, Formicidae, dentro da ordem Hymenoptera, que também inclui as abelhas e as vespas. As formigas cultivadoras de fungo pertencem à tribo Attini, inserida na subfamília Myrmicinae (Hölldobler & Wilson, 1990). Esta tribo apresenta grande distribuição geográfica, sendo encontrada no Novo Mundo, desde o sul dos Estados Unidos e norte do México (latitude 40° N) até o Uruguai e a região central da Argentina (latitude 44º S), excluindo a região dos Andes e algumas ilhas das Antilhas (Weber, 1966; Mariconi, 1970).

Treze gêneros pertencem a essa tribo (Fernández 2003): *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus, Mycetophylax*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Sericomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetarotes*, *Trachymyrmex*, *Pseudoatta, Acromyrmex* e *Atta*. Como se pode observar pelas Figuras 1 (modificado de Currie *et al.* 2006)) e 2 (baseado em Tree of Life Web Project e em Wetterer *et al.* 1998), a filogenia dessa tribo ainda é imprecisa para os gêneros mais basais, porém sabe-se que as formigas cortadeiras formam um grupo monofilético. Currie *et al.* (2006) dividem essa tribo em quatro grandes grupos (Figura 1): as attines basais ("paleo-attines"), as attines inferiores ("lower attines"), as attines superiores ("higher attines"), e as formigas cortadeiras ("leaf-cutting ants").

Formigas de *Acromyrmex* são moderadamente polimórficas, com quatro pares de espinhos no dorso enquanto que formigas de *Atta* são extremamente polimórficas (cabeça das menores geralmente menor que 1mm de largura e das maiores acima de 4,5 mm) e 3 pares de espinhos no dorso (Hölldobler & Wilson, 1990). Popularmente, formigas de *Atta* são conhecidas por saúvas e de *Acromyrmex*, por quenquéns.



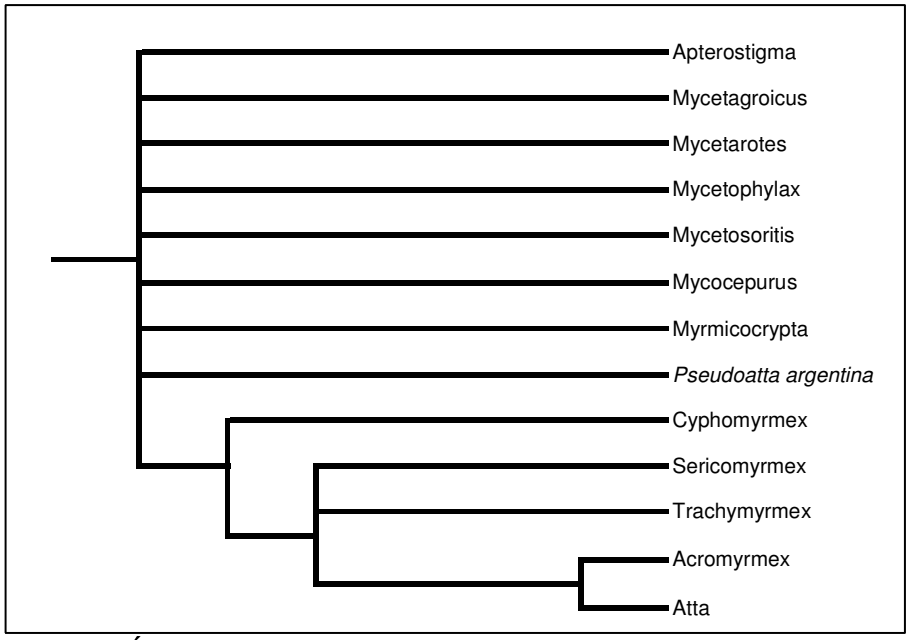


Figura 2: Árvore de Attini, baseado em http://tolweb.org/tree?group=Attini e em Wetterer *et al.* 1998

Figura 1: Filogenia de 9 gêneros de Attini (modificado de Currie *et al.* 2006). O fungo indica a origem das formigas cultivadoras de fungo. A formiga indica a origem das formigas cortadeiras. As cores representam os principais grupos de Attini.

No Brasil são conhecidas 11 espécies de saúvas, sendo a mais importante a *Atta sexdens rubropilosa* Forel (1908) conhecida popularmente por saúva-limão, pelo fato de desprender cheiro de limão quando esmagada. Essa espécie é encontrada nos estados brasileiros de Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (Mariconi, 1970).

As saúvas são herbívoros comuns de florestas. Coletam matéria orgânica vegetal, proveniente de folhas, flores, frutos e sementes, levando-a para seus ninhos, para servir de substrato para o crescimento de um fungo basidiomiceto específico.

A relação interespecífica entre as saúvas e o seu fungo é de mutualismo. O fungo não sobrevive na ausência das saúvas, pois recebe alimento, proteção e é disseminado a novos locais por elas. A colônia não sobrevive sem o fungo, pois este é fonte de alimento para as saúvas, sendo a única fonte de alimento para as pupas/larvas. As interações entre as formigas cortadeiras e o fungo mutualístico estão esquematizadas na Figura 3 e serão explicadas posteriormente.

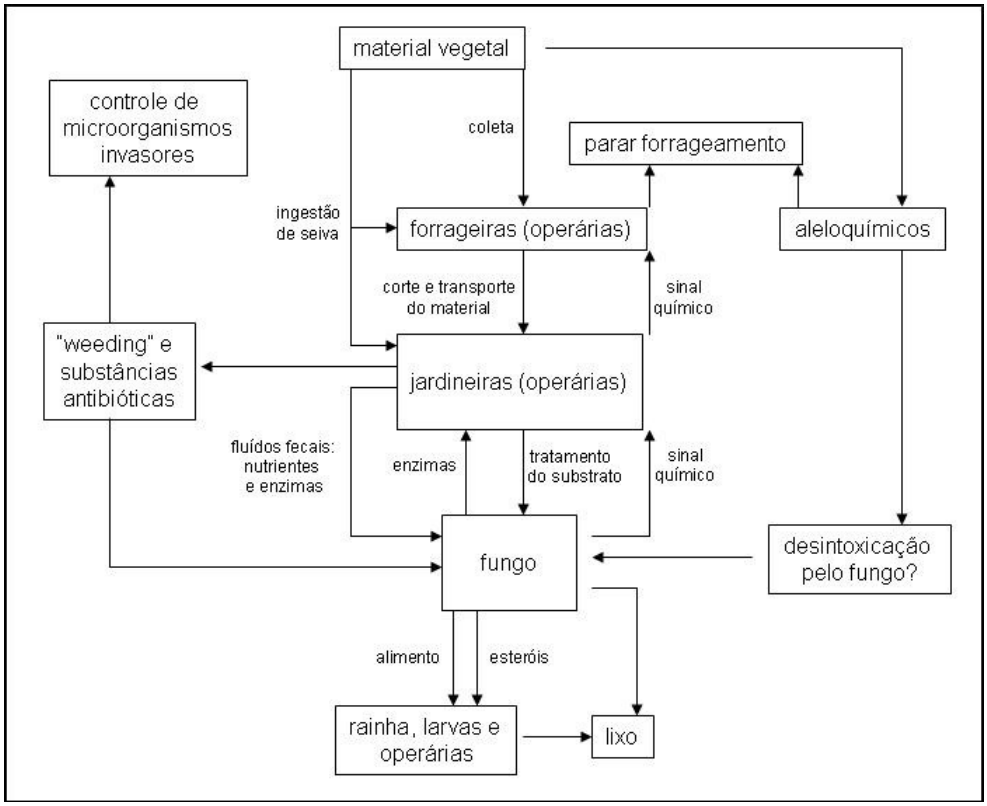


Figura 3: Interações entre formigas cortadeiras e fungo mutualístico, baseado em North *et al.* 1997.

A organização social das saúvas está entre uma das mais complexas encontradas em insetos sociais. As saúvas são importantes para os ecossistemas terrestres, possuindo importante papel na ciclagem de nutrientes. Entretanto, devido à ação humana sobre esses ecossistemas, esses insetos acabaram se tornando pragas na agricultura.

1.1.1. Os sauveiros

Os ninhos das saúvas, também conhecidos por sauveiros, são subterrâneos, com o material escavado sendo depositado na superfície, podendo chegar a até 40ton de terra. A colônia pode chegar a ocupar uma área de 600 metros quadrados, com 6 metros ou mais de profundidade (Wilson, 1990). Possuem centenas de câmaras (ou panelas) com um volume combinado estimado em 20 metros cúbicos, que são interligadas entre si e ao exterior por meio de túneis. Os ninhos de saúvas são grandes quando comparados aos de outras espécies de formigas cortadeiras.

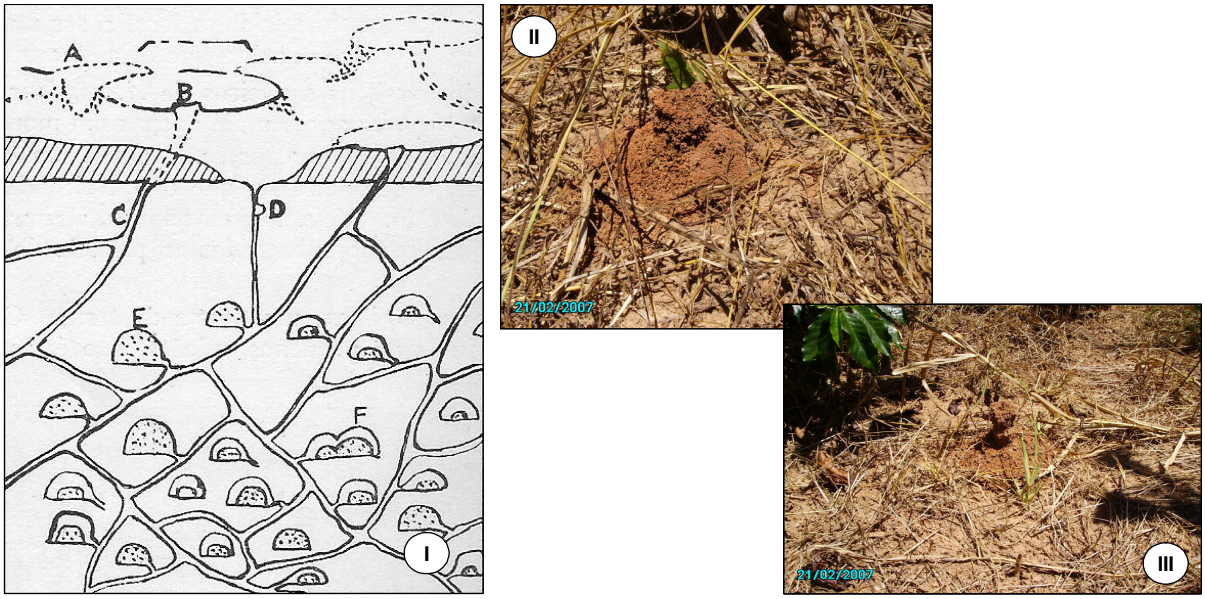


Figura 4: Esquema de um sauveiro (I) e fotos do olheiro de dois sauveiros distintos em campo (II e III), com aproximadamente 4 meses após a ocorrência de revoada.
No esquema (I) estão representados: A: terra solta na superfície do solo. B:olheiro. C: túnel. D: panela inicial. E: panela cheia de terra. F: panela com o cultivo do fungo. (Fonte: Mariconi, 1970).
Nas fotos (II e III), observa-se a formação de uma estrutura semelhante a uma torre de terra.
Fotos: C. H. Miyashira

Na superfície há estruturas, na forma de torres de terra, cercando as aberturas (olheiros) do sauveiro (Mariconi, 1970) (Figura 4II e 4III). Essas aberturas também auxiliam na circulação do ar. A atividade das saúvas e o metabolismo do fungo aumentam a temperatura da colônia, fazendo com que o ar quente suba pelos túneis centrais e ar fresco entre pelos olheiros laterais (Hölldobler & Wilson, 1990).

1.1.2. Anatomia

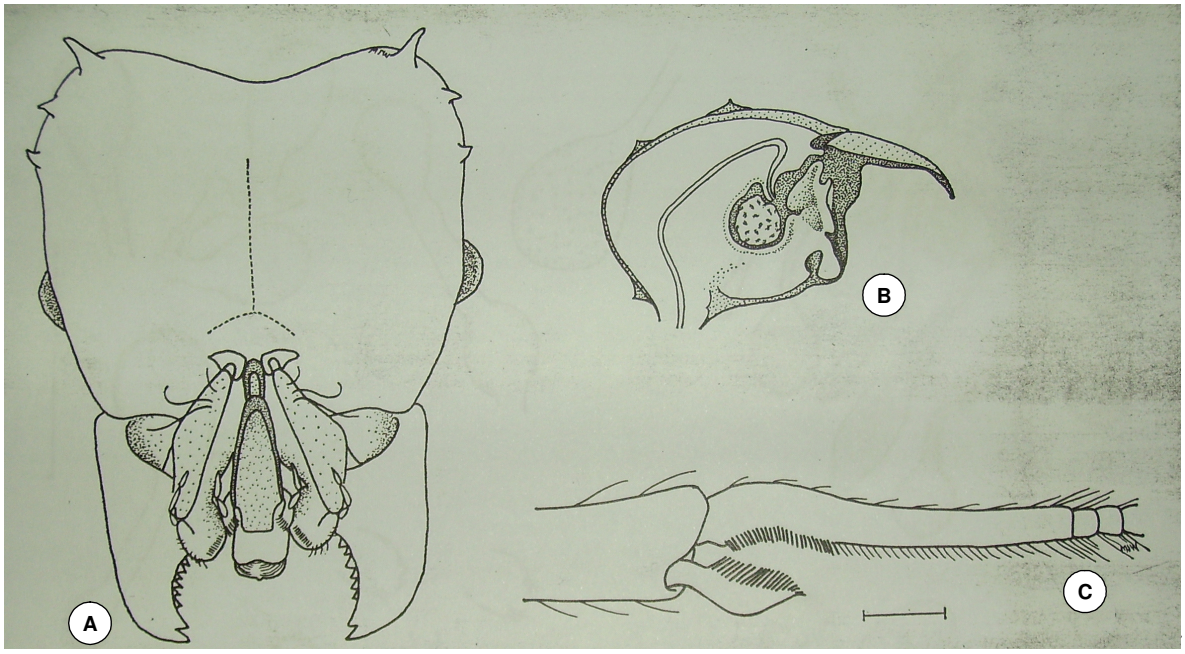
Saúvas de *Atta sexdens* seguem o padrão de corpo das formigas, mas possuem três pares de espinhos na cabeça e no dorso, para proteção contra predadores (Mariconi 1970). Outra característica é a cabeça grande, bi-lobada, supostamente para acomodar a musculatura responsável por mover as mandíbulas (Figura 5A).

Características anatômicas que são significativas na vida das formigas cultivadoras de fungo são: as peças bucais (essenciais para a limpeza e para o cultivo do fungo) (Figura 5A), a cavidade infrabucal (localizada atrás da boca e capaz de armazenar os dejetos de larvas/pupas e fragmentos do fungo) (Figura 5B) e o pente de cerdas das patas (utilizadas para a limpeza, Figura 5C) (Wheeler, 1965; Weber, 1956, 1966).

A rainha é a maior formiga da colônia. Em relação às operárias, o tamanho varia continuamente, da menor (com dois milímetros de comprimento), passando pela média, até a maior (incluindo os soldados, com 14 milímetros de comprimento) (Weber, 1966). Alguns pesquisadores consideram sete castas enquanto outros descartam essa divisão. A divisão do trabalho depende de dois fatores: a idade e o tamanho da operária.

Segundo Mariconi (1970) e Wilson (1990), as operárias de menor tamanho são responsáveis pelo cultivo do jardim de fungo, em cuidar dos ovos e das pequenas larvas. As de tamanho médio-pequeno cuidam também do jardim de fungo e da prole, mas são responsáveis pelo corte de folha. As de tamanho médio-maior são forrageadoras, escavadoras e protegem a colônia. As de maior tamanho são os soldados, e ficam no jardim de fungo, nas proximidades da rainha e da prole, saindo para defender o sauveiro, quando necessário. Suas mandíbulas são capazes de,

com uma mordida, produzir um corte de cinco milímetros na pele humana (Weber 1966).



bi-lobada de *Acromyrmex lundi* (Guérin), mostrando as peças bucais; B: corte transversal da cabeça de *Atta*, mostrando a cavidade infrabucal, atrás da boca, contendo um pedaço de fungo; C: parte da perna dianteira de um operária de *Atta*, mostrando o pente de cerdas usado para limpeza dos apêndices. A barra corresponde a 0,25 mm. (Fonte: Weber 1966).

A idade da operária tem influência na função que ela desempenha, influenciando então o padrão de divisão de trabalho observado para esses insetos. Inicialmente, a formiga é responsável por cuidados com a rainha e com a prole. Depois, participa da construção do ninho e do patrulhamento. Por fim, fica encarregada da proteção do ninho e do forrageamento. Esse padrão pode ser alterado sempre que uma determinada atividade seja prioritária em alguma situação (Wilson, 1990). Bot *et al.* (2002) relataram essa divisão de trabalho relacionada à idade, ao observar que expedições para forrageamento e manejo do lixo são executadas pelas saúvas mais velhas, por serem consideradas mais perigosas.

Para que essa organização em sociedade, com diversas atividades sendo realizadas ao mesmo tempo, obtenha sucesso, é necessária a existência de uma comunicação entre os indivíduos, fazendo com que o ninho, como um todo, atue como um organismo. Em formigas, os processos de comunicação dependem diretamente de produtos glandulares, sendo aproximadamente 90% feitos por ferormônios (Wilson, 1990). Hölldobler e Wilson (1990) citam doze tipos de

respostas: alarme, atração simples, recrutamento (para fonte de comida ou para o ninho), “grooming” (limpeza - será explicado no item 1.1.6.), trofilaxia (troca de líquidos orais e anais), troca de partículas sólidas de comida, efeito em grupo (induzindo ou inibindo uma determinada atividade), reconhecimento (de companheiras de ninho, membros de castas, indivíduos injuriados ou mortos), determinação de casta, controle de indivíduos reprodutivos, marcação territorial e comunicação sexual.

1.1.3. Desenvolvimento

As saúvas são, como os demais himenópteros, haplo-diplóides, pois os machos são haplóides e as fêmeas (rainha e operárias) diplóides. Ovos não fertilizados (haplóides) tornam-se machos enquanto os ovos fertilizados (diplóides) tornam-se fêmeas. Além disso, a rainha é capaz de controlar a fertilização dos ovos assim que são colocados, controlando assim a taxa de machos e fêmeas no ninho. A haploidia permite a eliminação de mutações recessivas letais (Goulet & Huber, 1993).

As saúvas, como todas as outras formigas, possuem quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Mariconi, 1970; Hölldobler & Wilson, 1990).

As castas dependem do ambiente em que vivem, sendo reguladas pelas operárias, ou pela rainha. O fator mais importante é a quantidade de comida, entretanto, sinais químicos também influenciam. Grandes quantidades de comida geram rainhas, enquanto um pouco menos de comida geram soldados. Uma diminuição em uma das castas leva à produção de mais indivíduos dessa casta (Wilson, 1990).

A ninhada de *Atta sexdens* normalmente é envolvida por micélio do fungo. Quando as partes bucais das larvas desenvolvem-se, as operárias passam a colocar pedaços de fungo nas suas bocas. As operárias também realizam a limpeza durante todo o processo de desenvolvimento. Portanto, as larvas são incapazes de se desenvolverem sozinhas. O grande cuidado com a ninhada reforça o alto grau de desenvolvimento social apresentado por esses insetos (Weber, 1966).

1.1.4. Forrageamento

As saúvas de *Atta sexdens* forrageiam espécimes vegetais a até 100 metros de distância do sauveiro. As primeiras saúvas deixam uma trilha de ferormônio após descobrir uma fonte vegetal. Outras saúvas seguem esse sinal químico até a fonte vegetal, limpando o caminho e formando uma trilha, permitindo que as saúvas caminhem rapidamente (Hölldobler & Wilson, 1990).

O período do dia em que esse forrageamento é feito também sofre influência de outros fatores ambientais. Na época seca, o forrageamento é predominantemente noturno, e diurno na época chuvosa, provavelmente induzido por transformações sazonais no padrão de chuvas, insolação, cobertura vegetal e temperatura ambiental, que precisa estar entre 12ºC e 30ºC (Rockwood, 1975; Hölldobler & Wilson, 1990). Na época seca, o forrageamento pode acontecer também durante o dia, aparentemente para prover o fungo com maiores quantidades de açúcares, ácidos aminados e substâncias aromáticas que em algumas plantas estão presentes em maiores concentrações nesse período (Lewis *et al.*, 1974).

As saúvas desenvolveram um sistema de conservação que previne uma "super-exploração" e a conseqüente destruição da vegetação próxima ao ninho. Não atacam indivíduos aparentemente melhores e mais próximos quando já estão explorando indivíduos da mesma espécie a grandes distâncias do sauveiro (Rockwood, 1976, 1977; Rockwood & Hubbell, 1987). Maximizar a quantidade de nutrientes e minimizar a quantidade de metabólitos secundários tóxicos parece ser mais importante que minimizar os custos com deslocamento atacando plantas próximas ao sauveiro (Rockwood, 1977). É bastante discutido que a agricultura interrompa esse sistema, levando esses insetos a atacarem as culturas humanas e serem considerados pragas (Cherrett 1968).

Como o material coletado é incorporado ao fungo e não diretamente consumido pelas saúvas, é esperado um comportamento forrageiro de selecionar plantas que possuam características físicas e/ou químicas que promovam o crescimento máximo do fungo.

1.1.5. Cultivo do fungo e alimentação

O cultivo de espécies para alimentação evoluiu poucas vezes no reino animal. Os exemplos mais notórios são: as formigas e os cupins cultivadores de fungo, os besouros de ambrosia e os humanos. O cultivo de fungo, ou fungicultura, pelos insetos e o cultivo de plantas pelos humanos compartilham das mesmas definições de agricultura (Mueller *et al.*, 2005): plantio de espécies em hábitat particular ou substratos particulares; cultivo voltado para a melhoria de condições de crescimento ou proteção contra herbívoros/fungívoros, parasitas ou doenças; colheita do cultivar para alimentação; e obrigatória dependência nutricional.

Os insetos propagam clonalmente suas monoculturas dentro do ninho e ao longo das gerações. Cerca de 210 espécies de formigas cortadeiras cultivam fungos derivados milhões de anos atrás de fungos agáricos livres (Chapela *et al.,* 1994; Moncalvo *et al.*, 2002). Diferentes linhagens de formigas cultivam seus fungos em diferentes substratos. As conhecidas por attines inferiores ("lower attines") utilizam como substrato partes de flores, fragmentos de artrópodes, sementes e fragmentos de madeira, enquanto as formigas cortadeiras utilizam folhas e flores frescas (Mueller *et al.* 2005).

Apenas as formigas cultivadoras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* cultivam fungo da família Agaricaceae (Clémençon, 2004). Esse fungo foi identificado como *Leucoagaricus gongylophorus* (=*Leucocoprinus gongylophorus*) por vários autores: Bononi *et al.* (1981) analisando basidiomas de sauveiros de *Atta sexdens rubropilosa,* Fisher *et al.* (1994) analisando basidiomas formados em sauveiro de *Atta cephalotes*; Silva-Pinhati *et al.* (2004) usando marcadores moleculares.

Como as demais formigas cortadeiras, saúvas de *Atta sexdens* alimentam-se dos gongilídeos produzidos pelo fungo. Gongilídeos, do termo em inglês "gongylidius", são células em forma de vesículas localizadas no final das hifas (Figura 6). Para as larvas, o fungo é a única fonte de alimento, fornecendo uma dieta rica em proteínas, para seu crescimento e desenvolvimento, além de energia através de lipídios, para suas necessidades respiratórias. Para as saúvas adultas, já desenvolvidas totalmente, a ingestão do fungo representa uma pequena parcela de suas necessidades metabólicas (aproximadamente 9,0 %), sendo a maior parte obtida através da ingestão de seivas (Quinlan & Cherrett, 1979; Bass & Cherrett, 1995).

As saúvas cortam a vegetação em fragmentos pequenos que são transportados aos ninhos. Esses fragmentos são colocados na base, na lateral e no topo da câmara do jardim de fungo. A seguir, os fragmentos são cortados em pedaços menores, de um a dois milímetros de diâmetro, processo no qual o material é todo lambido. Ao final, o material é incorporado ao jardim de fungo (Weber, 1966). As saúvas podem depositar um líquido fecal sobre o material ou sobre o fungo (Haines, 1978). Esse líquido é composto por alantoína, ácido alantóico, amônia, 21 ácidos aminados e proteases (Martin & Martin, 1970). Assim, as saúvas fornecem ao fungo, que é deficiente em protease, substâncias nitrogenadas e proteases, reforçando bioquimicamente a idéia de mutualismo entre essas espécies. Esse processo sugere que a maior parte dos excrementos das saúvas deve ser depositada no fungo ao invés de ser descartada (Haines, 1978). Richard *et al.* (2005) sugerem que as formigas e seu fungo possuem atividades enzimáticas complementares, pois as formigas são especializadas em degradar substratos de baixo peso molecular (oligossacarídeos e heterosídeos) enquanto o fungo demonstra alta atividade polissacaridase (possui forte atividade amilolítica).

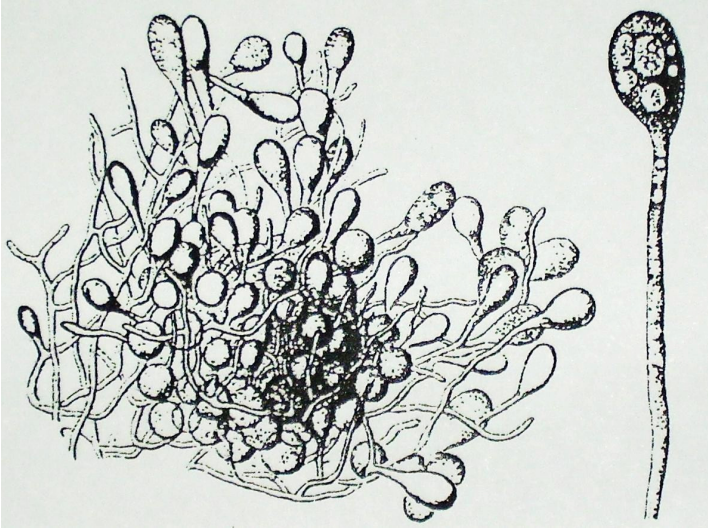


Figura 6: À esquerda, esquema de um conjunto de gongilídeos; à direita, esquema de uma hifa com os gongilídeos. (Fonte: Clémençon, 2004).

As operárias também são responsáveis pela limpeza do fungo, retirando espécies invasoras (“weeding”), utilizando secreções produzidas em suas glândulas salivares e mandibulares e antibióticos produzidos pela bactéria *Pseudonocardia* (Currie *et al.* 1999), afim de manter o jardim de fungo numa restrita monocultura.

1.1.6. Defesas contra outros organismos

Viver em sociedade pode ser associado a um custo significativo, o aumento do risco de transmissão de doenças, devido aos indivíduos serem muito semelhantes e proximamente relacionados e à alta densidade de indivíduos hospedeiros (Freeland, 1976). Entretanto, esse custo pode ser superado pelos benefícios, através do desenvolvimento de comportamentos e defesas contra parasitas.

Os insetos sociais, apesar de possuírem condições favoráveis à transmissão de doenças, demonstram complexos mecanismos de defesa que resultam em indivíduos possuidores de grande resistência às doenças quando estão em grupo (Rosengaus *et al.*, 1998; Traniello *et al.*, 2002).

As saúvas de *Atta sexdens* dedicam grande parte do tempo realizando a limpeza umas das outras e da rainha. Espalham em seus corpos, líquidos microbicidas produzidos em suas glândulas. Todo o lixo produzido pelo sauveiro é carregado à panela de lixo. Entretanto, as fezes não são levadas a essa panela, pois são utilizadas para fertilizar o jardim de fungo (Haines, 1978). Na panela de lixo, o material se decompõe oferecendo menor perigo às saúvas. A finalidade dessas ações é evitar infecções, especialmente por fungos parasitas como *Cordyceps* (Ascomicetes: Clavicipitaceae), capazes de matar as saúvas.

Alguns patógenos de insetos são capazes de vencer a resposta imune do inseto hospedeiro. Mecanismos de defesa, como o ato de se limpar com as patas utilizando movimentos de varredura ("grooming") e as secreções antibióticas são fundamentais para prevenir a contaminação por esses patógenos (Hölldobler & Wilson, 1990).

Hughes *et al.* (2002) realizaram testes expondo formigas ao fungo parasita *Metarhizium anisopliae*. Os autores observaram que os insetos sobreviveram mais quando foram mantidos com formigas companheiras de ninho, do que quando isoladas, devido à existência de três mecanismos de defesa: auto-limpeza, limpeza da companheira e secreção de substâncias antibióticas. A eficiência da transmissão do patógeno diminuiu com o aumento da densidade do hospedeiro.

Esses comportamentos de limpeza podem explicar o porquê de poucas doenças serem conhecidas entre as formigas cortadeiras e o porquê de tentativas de controle biológico com patógenos serem problemáticas.

A importância da glândula metapleural na resistência a doenças foi demonstrada em bioensaios realizados por Poulsen *et al.* (2002). Substâncias antibióticas secretadas por essa glândula são as principais razões da redução da viabilidade de esporos de patógenos em formigas.

Outro procedimento para evitar parasitas é o posicionamento de pequenas saúvas no pedaço de folha carregado por outra saúva. Dessa forma, a formiga carregada protege contra ataques de insetos parasitas, como por exemplo, por mosquitos da família *Phoridae*. Esses mosquitos colocam ovos nas saúvas e as larvas se alimentam do inseto ainda vivo (Hölldobler & Wilson, 1995).

A capacidade em cultivar o fungo depende da capacidade em protegê-lo de patógenos. Juntamente com o fungo mutualista existem outros microrganismos. Craven *et al.* (1970) observaram a existência de numerosas leveduras e de bactérias nas regiões novas e velhas do fungo. No material existente na panela do lixo também foram encontrados fungos filamentosos, além das leveduras e bactérias.

Bot *et al.* (2001) observaram que o fungo *Escovopsis weberi* (Ascomycota, Hypocreales), um parasita específico para o fungo mutualista, é abundante no material do lixo, sendo necessário um cuidado no manejo desse lixo pelas saúvas. Uma solução encontrada para minimizar o perigo do contato com o lixo pelas saúvas é deixar essa atividade para as saúvas mais velhas, que parecem ser menos valiosas para a colônia.

A proteção fornecida ao fungo pelas formigas é feita por diversas formas: remoção de esporos invasores do jardim de fungo, remoção de substratos infectados (“weeding”) (Currie *et al.*, 2001), utilização de substâncias secretadas pelas glândulas metapleurais e mandibulares, que apresentam atividade microbicida (Beattie *et al.*, 1986; Nascimento *et al.*, 1996; North *et al.*,1997; Bot *et al.*, 2002), manutenção de uma relação mutualística com uma bactéria *Pseudonocardi*a e um comportamento de higiene e de manejo do lixo (Bot *et al.*, 2001). Há algumas evidências da habilidade de auto-defesa do fungo mutualístico devido ao isolamento de uma substância anti-bacteriana, a lepioclorina (Nair & Hervey, 1979).

A descoberta de um terceiro integrante nessa relação formiga-fungo indica que, na verdade, ocorre um mutalismo entre três organanismos, as formigas cortadeiras, o fungo leucocoprino e a bactéria. Essa bactéria foi primeiramente identificada como do gênero *Streptomyces* (Streptomycetaceae: Actinomycetes), porém, em estudo recente realizado por Cafaro & Currie (2005), é classificada como pertencente ao

gênero *Pseudonocardia* (Pseudonocardiaceae: Actinomycetales). Essa bactéria vive em uma estrutura especial na cutícula das formigas e produz substâncias antibióticas capazes de reduzir o crescimento do fungo *Escovopsis weberi* (Currie *et al.*, 1999). Essa cutícula difere da cutícula dos outros gêneros de formigas que não cultivam fungo (Currie *et al.*, 2006).

A glândula metapleural possui uma poderosa defesa contra outros microrganismos que apareçam na interação formiga-fungo. Líquidos das glândulas metapleurais suprimem a germinação de esporos de fungos invasores (Beattie *et al.*, 1986). Bot *et al.* (2002) realizaram uma análise detalhada da ação de sete classes de substâncias da glândula metapleural: ácido acético, ácidos graxos de cadeia curta, de cadeia média e de cadeia longa, ácido indolacético, γ-lactonas e γ-cetoácidos. Todas essas classes inibiram o crescimento de ao menos um dos microrganimos testados (duas espécies de bactérias e sete espécies de fungos). Entretanto, hifas de *Escovopsis* não foram afetadas por essas substâncias.

É possível que as propriedades antibióticas desses ácidos sejam secundárias e que sua função primária seja potencializar o efeito de outras substâncias. Uma possível função de todos os ácidos dessa glândula seria manter o pH baixo. Kreisel (1972) mostrou que alguns dias após a remoção de todas as formigas do cultivo do fungo, o pH foi aumentando gradualmente e o cultivo do fungo foi rapidamente atacado por fungos e bactérias oportunistas.

Santos *et al.* (2004) isolaram a bactéria *Burkholderia* sp de fungos cultivados em sauveiros de *Atta sexdens rubropilosa*. Esses autores observaram que essa bactéria secreta um potente anti-fúngico que inibe a germinação dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizum anisopliae*, do saprofítico *Verticilium lecanii* e do fungo especialista *E. weberi*.

1.1.7. Formação de novas colônias

O ciclo de vida de uma colônia pode ser dividido em três fases: de fundação, ergonômica e reprodutiva (Oster & Wilson, 1978).

A fase de fundação começa com o vôo nupcial ou revoada. No estado de São Paulo a época de revoada ocorre entre Setembro e Novembro. Nessa época, os

sauveiros possuem formas aladas, as rainhas virgens e os machos, que são as únicas formas reprodutivas da colônia (Mariconi, 1970; Goulet & Huber, 1993).

Antes do vôo nupcial, as jovens rainhas coletam um fragmento do fungo, armazenando-o na cavidade infrabucal. Durante o vôo, as rainhas copulam com diversos machos. Os machos possuem função apenas de reprodução e são transitórios, não ajudam nos trabalhos da colônia, vivendo apenas para o vôo nupcial, morrendo logo a seguir (Hölldobler & Wilson, 1990; Wilson, 1990). A rainha armazena os espermatozóides na espermateca para o resto de sua vida. Após a cópula com três a oito machos, a espermateca da rainha possui entre 200 e 300 milhões de espermatozóides (Kerr, 1961). Os espermatozóides são mantidos vivos na espermateca por anos, aparentemente devido a um fluído nutritivo secretado por glândulas apendiculares (Wheeler,1965).

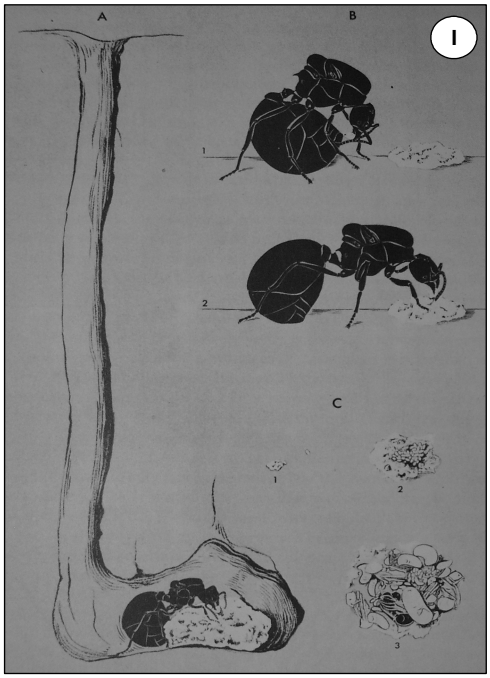


Figura 7: I - Esquema de um sauveiro em fase inicial: (A) uma rainha em sua primeira panela, com o início de um jardim de fungo; (B) a rainha coletando e aplicando uma gota de secreção anal no fungo; (C) três fases do desenvolvimento do jardim de fungo e a primeira ninhada (Fonte: Hölldobler & Wilson, 1990). II - Imagem de uma rainha cuidando de sua primeira ninhada. Foto: C. H. Miyashira

Após a cópula, a rainha pousa no solo e se desfaz de suas asas. A seguir, começa a escavar o solo, construindo um túnel entre 8,5 e 15 cm de profundidade (Figura 7I). Ao final do túnel, escava uma pequena câmara onde expele o fragmento do fungo e coloca alguns ovos (Figura 7I, 7II). Inicialmente, o fungo é fertilizado

apenas com gotas anais (Figura 7I), algumas vezes sendo necessária pequena quantidade de material vegetal, coletada pela própria rainha (Mariconi, 1970).

Entre os 40 e 60 dias antes das primeiras operárias aparecerem, aproximadamente 90% dos ovos depositados pela rainha são consumidos (ovos de alimentação). É possível distinguir morfologicamente os dois tipos de ovos (fecundados e de alimentação). Os ovos de alimentação são maiores e mais globulosos que os ovos fecundados (Autuori, 1940; Mariconi, 1970). A rainha consome esses ovos de alimentação ou os fornece para as primeiras larvas (Weber 1966). Os músculos responsáveis pelo vôo e a gordura corporal são metabolizados pela rainha para obtenção de energia, sendo essa conversão um avanço evolutivo vital em Formicidae (Hölldobler & Wilson, 1990).

As primeiras operárias são muito pequenas, possuindo um comportamento tímido, e são responsáveis pelas mesmas atividades de uma operária de tamanho normal de um formigueiro adulto. O tamanho pequeno e o comportamento tímido demonstram o cuidado da estratégia de investimento da colônia, que precisa maximizar o número de operárias e suas taxas de sobrevivência e minimizar perdas de recursos (Oster & Wilson, 1978). Essas operárias passam a realizar a manutenção da colônia, ficando a rainha responsável por colocar e fertilizar os ovos. Com o passar das semanas e meses, a população e o tamanho das operárias aumentam. Quando as atividades da colônia estão voltadas para o seu crescimento, ela está na fase ergonômica (ou exponencial).

Após certo período de crescimento a colônia atinge a maturidade e começa a produzir novas rainhas e machos, chegando à fase reprodutiva. As formas sexuais deixam o sauveiro para fundar novas colônias, começando um novo ciclo de vida. Para *Atta colombica*, um sauveiro é considerado adulto quando possui entre 1 e 2,5 milhões de operárias (Hölldobler & Wilson, 1990).

Se protegida de enchentes e da ação humana, uma colônia adulta, com milhões de operárias, enfrenta poucos perigos, sendo destruída apenas com a morte da rainha, que possui expectativa de vida de até 20 anos (Mariconi, 1970).

1.1.8. Impacto Ecológico e Econômico

Segundo Wilson (1990), as formigas cortadeiras são importantes herbívoros, consumindo entre 12 e 17% da massa foliar produzida por florestas tropicais. Cada colônia coleta e processa centenas de quilogramas de material vegetal por ano. Entretanto, é importante ressaltar que as formigas cortadeiras ingerem apenas as seivas vegetais, sendo a maior parte do material vegetal consumido pelo fungo mutualista (Currie, 2002).

As saúvas são importantes na transformação do solo, sendo em algumas áreas mais importantes que os cupins e as minhocas (Wilson, 1990). Afetam propriedades do solo devido às alterações físicas e à importação de grandes quantidades de matéria orgânica para camadas profundas do subsolo. Efeitos físicos incluem mudanças na densidade, textura e porosidade, provocando a diminuição da resistência à penetração em solos próximos ao sauveiro, causando assim o aumento do comprimento de raízes (Odling-Smee *et al.*, 2003). Auxiliam na aeração do solo e na infiltração da água devido ao sistema de túneis dos sauveiros e tomam parte na ciclagem de nutrientes, aumentando a circulação de diversos elementos químicos (Haines, 1978, Hölldobler & Wilson, 1995).

O depósito de material nas panelas de lixo provoca uma ciclagem de nutriente 48 vezes maior por m² quando comparado à ciclagem sem as saúvas. Próximos às panelas de lixo, as plantas apresentam aumento na área de suas raízes, possibilitando uma maior absorção de nutrientes. Isso sugere que a maioria dos nutrientes trazidos para a colônia é reciclada, retornando à vegetação, ao invés de serem levados pela infiltração de água aos lençóis freáticos (Haines, 1978).

O solo ao redor dos formigueiros possui altos níveis de carbono, nitrogênio e fósforo (Wilson, 1990). Verchot *et al.* (2003) detectaram maiores quantidades de nitratos no solo próximo ao sauveiro, indicando que são difundidos do sauveiro para o solo, onde podem ser aproveitados pelas plantas.

Apesar de ser aceito atualmente que o fungo mutualístico é um basidiomiceto saprofítico, Abril & Bucher (2004) indicam que o fungo, que utiliza nutrientes solúveis, não tem habilidade para quebrar polímeros complexos, que caracteriza os basidiomicetos saprofíticos. Assim, o fungo parece ser um típico basidiomiceto biotrófico, funcionalmente similar às micorrizas. As implicações ecológicas da natureza não saprofítica do fungo são grandes, pois um volume muito grande de

material vegetal é necessário para sustentar um formigueiro, ao contrário do que seria se o fungo fosse saprofítico. Isso pode explicar um pouco da importância ecológica das formigas cortadeiras e o motivo de tornarem-se pragas para algumas culturas humanas. Além disso, um volume significante de material vegetal não utilizado é jogado como lixo, favorecendo a ciclagem de nutrientes e mudanças nas características do solo.

As saúvas são capazes de se adaptarem rapidamente aos cultivos da agricultura humana. Conseqüentemente, são consideradas as principais pragas na América tropical, destruindo bilhões de dólares de cultivares anualmente (Wilson, 1990, Hölldobler & Wilson, 1995). No Brasil, as saúvas atacam principalmente áreas de reflorestamento de *Eucalyptus* e plantações de *Citrus* (Odling-Smee *et al.*, 2003).

1.1.9 Combate

A utilização de produtos químicos no controle de pestes remonta há 1000 anos a.C., quando civilizações como a romana, a grega e a chinesa utilizavam enxofre, arsênico e extratos de plantas para controle de parasitas, tanto do homem quanto de animais e vegetais.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) define praga como organismos vivos que ocorrem onde não são desejados ou causam danos a plantações, aos humanos ou aos animais, e pesticida como qualquer substância ou combinações de substâncias destinadas a prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer praga. O termo pesticida refere-se a inseticida, herbicida, fungicida e muitas outras substâncias usadas para controlar pragas (About pesticide, 2007).

Devido à sua natureza, pesticidas podem apresentar riscos à saúde humana, pois são designados para matar ou afetar organismos vivos. Ao mesmo tempo, os pesticidas são úteis para a sociedade, pois podem matar organismos transmissores de doenças ou que causam danos às plantações. Devido à existência de riscos e benefícios, há uma busca por produtos mais específicos e menos tóxicos, para proteção ambiental e humana.

Metabólitos secundários presentes em algumas plantas podem ser prejudiciais para as formigas cortadeiras e/ou para seu fungo mutualista. Diversos trabalhos já foram realizados buscando alternativas para o combate das formigas cortadeiras, alguns descritos resumidamente no Quadro 1.

Quadro 1 – Trabalhos buscando alternativas para o controle de formigas cortadeiras.

Espécies	Substâncias	Atividade	Testado em	Formiga cortadeira	Referências
Beauveria bassiana *Metarhizium anisopliae*		patogênico	saúvas	*Atta sexdens piriventris*	Diehl-Fleig *et al.* (1988)
Beauveria bassiana *Metarhizium anisopliae*		patogênico	saúvas e sauveiros	*Atta sexdens piriventris*	Silva e Diehl-Fleig (1988)
Hymenaea courbaril *Melampodium divarticatum* *Vismea baccifera*	colavenol cariofileno epóxido de cariofileno nerolidol	sem efeito diminui crescimento (fungo) diminui sobrevivência (saúvas) e crescimento (fungo) inibe crescimento (fungo)	saúvas e fungo	*Atta cephalotes*	Howard *et al.* (1988)
Sesamum indicum	extrato CL extrato ME extrato ME+CL extrato aquoso	diminui crescimento (30 e 60 mg/mL) diminui crescimento (30 e 60 mg/mL) diminui crescimento (30+30 e 60+60 mg/mL) sem efeito	fungo	*Atta sexdens rubropilosa*	Pagnocca *et al.* (1990)
Virola sebifera *Virola* sp. *Otoba parvifolia*	lignanas	diminui crescimento (sesamina, eudesmina, filigenol, lignana e epigalgavrina)	fungo	*Atta sexdens rubropilosa*	Pagnocca et al. (1996)
Canavalia ensiformis	extrato HE extrato DE extrato ME ácidos graxos	inibiu crescimento (1000 µg/mL) diminui crescimento (600, 1000 e 5000 µg/mL) diminui crescimento (5000 µg/mL) inibiu crescimento (fração 9)	fungo	*Atta sexdens*	Monteiro *et al.* (1998)
Sesamum indicum	extrato HE extrato DE extrato ME	diminui ou inibe crescimento (depende da fração e concentração)	fungo	*Atta sexdens*	Ribeiro *et al.* (1998)
Citrus sinensis *Citrus limon* *Citrus reticulata*	extrato HE extrato DE extrato supercrítico CO2	diminui sobrevivência (saúvas) e crescimento (fungo)	saúvas e fungo	*Atta sexdens*	Fernandes *et al.* (2002)
Coffea arabica *Coffea canephora* *Coffea racemosa* *Coffea salvatrix* híbridos de *Coffea*	cafeína ácido clorogênico ceras epicuticulares	dissuasão (0,15%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 0,7%) sem efeito dissuasão	sauveiros	*Atta sexdens rubropilosa*	Afonso (2002)
Metarhizium anisopliae *Trichoderma viride*		morte dos sauveiros	sauveiros	*Atta cephalotes*	Lopez & Orduz (2003)
Ricinus communis	extratos HE, DE, ME e EA ricinina	diminuem (HE e ME) ou inibem crescimento (DE) do fungo diminuem sobrevivência (HE, DE, ME e EA)	saúvas e fungo	*Atta sexdens rubropilosa*	Bigi *et al.* (2004)
Citrus limonia *Adiscanthus fusciflorus* *Picramnia teapensis* *Pilocarpus riedelianus*	cumarinas	diminui crescimento (angelicina, umbeliferona, PBO e substância 8) inibe crescimento (clausarina)	fungo	*Atta sexdens*	Godoy *et al.* (2005)
Beauveria bassiana *Metarhizium anisopliae*		diminui sobrevivência (saúvas) diminuição maior quando combinados com imidacloprid	saúvas	*Atta sexdens rubropilosa*	Santos *et al.* (2007)

CL = clorofórmio
HE = hexano
DE = diclorometano
ME = metanol
EA = acetato de etila

1.2. Cafeína

A cafeína (3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona), também conhecida por 1,3,7-trimetilxantina, é um alcalóide metilado, do grupo das xantinas (Figura 8). A cafeína é sintetizada a partir de xantosina, via 7-metilxantosina, 7-metilxantina e teobromina e o grupamento doador de metilas é a S-adenosilmetionina (SAM) (Suzuki *et al.,* 1992). As metilxantinas estão envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono, entretanto, possuem papéis que diferem de vegetal para vegetal ou mesmo em tecidos do mesmo vegetal. Por exemplo, nas folhas de *Camellia* spp. a cafeína está envolvida nos processos metabólicos; nas flores e frutos secos, a cafeína parece ser um produto final e inerte do metabolismo da planta; já nas sementes, não possui função como reserva de nitrogênio, mas sim atua como substância alelopática (Suzuki *et al.*, 1992). Mazzafera *et al.* (1996) indicaram a função alelopática e anti-herbivórica para a cafeína presente nas folhas de chá e café. Outros trabalhos relatam a ação tóxica da cafeína contra outros seres vivos (ver item 1.2.2. Ação contra outros seres vivos).

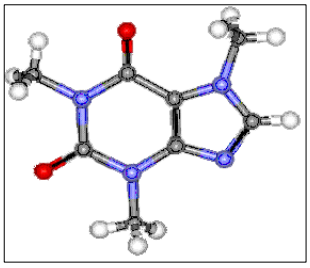


Figura 8: Imagem em três dimensões da molécula da cafeína. Átomos de oxigênio estão representados pelas bolas em vermelho; de nitrogênio, em azul; de oxigênio em branco; em cinza, os carbonos.
(Fonte: http://www.erowid.org/chemicals/caffeine/images/archive/caffeine_3d.jpg).

A cafeína é um metabólito secundário encontrado em mais de 60 espécies vegetais, nas quais pode atuar como inseticida natural, afastando alguns tipos de insetos. É o alcalóide mais importante e abundante no café (*Coffea* sp).

A cafeína é um estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), possuindo efeito inibidor do sono, restaurando a atenção e fornecendo uma “dose extra” de energia (Medline Plus: Caffeine, 2007). Bebidas contendo cafeína, como café, chá, refrigerante e energético, possuem grande popularidade. A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo, mas ao contrário das outras substâncias psicoativas, é legalizada e regulamentada em todos os países. O órgão responsável pelos assuntos de vigilância sanitária dos Estados Unidos, a “Food and Drug

Administration" (FDA), considera a cafeína uma substância reconhecidamente segura quando utilizada em bebida, de acordo com boas práticas de produção (Código de Regulamentos Federais, 2007).

Vegetais que possuem cafeína estão distribuídos principalmente nos gêneros *Coffea* (Rubiaceae), *Cola* e *Theobroma* (Malvaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Camellia* (Theaceae = Ternstriemiaceae).

Comercialmente, a principal fonte mundial de cafeína é a semente de café, das quais é feita a bebida. A concentração de cafeína na bebida varia de acordo com a espécie de café e do método de preparação utilizado. Em geral, 60 mililitros da bebida, equivalente a uma xícara, possuem aproximadamente entre 40 mg e 60 mg de cafeína (Camargo & Toledo, 1998). Outros exemplos da presença da cafeína (valores aproximados): uma xícara de 180 mL de chá contém 70 mg de cafeína; bebidas baseadas em cola contêm 40 mg em 355 mL (uma lata); 30 g de chocolate ao leite contém entre 1 mg e 15 mg; em medicamentos, a concentração pode variar desde 30 mg por tablete até 200 mg por tablete (Erowid Caffeine Vault: Content in Beverages, 2007).

Outras fontes comerciais de cafeína, além das sementes de café, são: sementes de cacau, as nozes de cola e folhas de chá. Folhas de *Coffea arabica* contêm, aproximadamente, 21,9 g de cafeína por kg de folha seca, equivalente a 0,219% do peso da folha (Mazzafera, 1999).

1.2.1. Mecanismo de ação em seres humanos

A cafeína possui muitos efeitos farmacológicos, a maioria podendo ser ligada ao bloqueio dos receptores de adenosina, à inibição das fosfodiesterases e à liberação de cálcio de reservas intracelulares (McPherson *et al.*, 1991; Alberts *et al.* 1997; Daly, 2000; Fisone *et al.*, 2004). A cafeína pode atuar tanto como agonista (substância que se liga a um receptor, disparando respostas na célula) como antagonista (se liga ao receptor inibindo ou impedindo a ação de um agonista) (Fisone *et al.* 2004).

Como o álcool, a nicotina e os anti-depressivos, a cafeína rapidamente cruza a barreira hematoencefálica (que protege o cérebro de produtos químicos presentes no sangue) devido à sua propriedade lipofílica e semelhança com os precursores de

ácidos nucléicos – purinas e nucleosídeos de purinas (McCall *et al.*, 1982). No cérebro, devido a estrutura da cafeína ser semelhante a da adenosina, o principal modo de ação é antagonizar os receptores de adenosina, como os receptores de proteína G, provocando redução da atividade da adenosina (Fisone *et al.*, 2004). Essa redução pode provocar um aumento da atividade do neurotransmissor dopamina (responsável pelo efeito estimulatório, provocando aumento da atividade motora e diminuição da fadiga durante atividade física) e/ou na inibição da enzima adenosina monofosfato cíclica (AMPc) fosfodiesterase (Ferré *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 2003). Essa enzima é responsável pela conversão nas células da AMPc para a sua forma não-cíclica (AMP). Essa inibição intensifica e prolonga o efeito da dopamina e de drogas semelhantes, como as anfetaminas (Sutherland & Rall, 1958; Butcher & Sutherland, 1962; Fisone *et al.*, 2004). O aumento da concentração de AMPc nas células aumenta a ativação da proteína quinase A (PKA) que aumenta a hidrogênio potássio ATPase (H+/K+ ATPase), resultando no aumento da secreção de ácido gástrico pelas células (Alberts *et al.*, 1997). A inibição de adenosina é relevante para suas propriedades diuréticas da cafeína. Como a adenosina é conhecida por contrair as arteríolas aferentes do glomérulo, sua inibição causa vasodilatação, aumentando o fluxo de sangue e a taxa de filtração glomerular. Ao antagonizar os receptores de adenosina, a cafeína também aumenta os níveis de epinefrina/adrenalina, estimulando o Sistema Nervoso Simpático, aumentando os batimentos cardíacos, a pressão arterial, o fluxo sanguíneo aos músculos, e diminuindo o fluxo de sangue para a pele e órgãos internos.

A liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) pode ocorrer pelo fato da cafeína se ligar aos receptores rianodínicos, ativando os canais de cálcio e liberando íons cálcio do retículo endoplasmático (McPherson *et al.* 1991), ou pelo fato da cafeína impedir o acoplamento do ácido gama-aminobutírico (GABA) e diazepam nos receptores $GABA_A$ (Shi *et al.,* 2003). O Ca^{2+} é um dos mais importantes mensageiros intracelulares em muitos processos biológicos. Ele ativa diretamente canais de cloro e de potássio, provocando assim a liberação de neurotransmissores, e afeta indiretamente canais e outras proteínas, através de proteínas quinases e fosfatases dependentes de cálcio (Kennedy, 1989). Também está envolvido no controle da excitabilidade da membrana neuronal, neurosecreção, plasticidade sináptica (remodelação das sinapses), expressão genética, morte celular programada e

mudanças no citoesqueleto (Bennett & Weeds, 1986; Blaustein, 1988; Miller, 1988; Ghosh & Greenberg, 1995).

Os metabólitos resultantes da degradação da cafeína também contribuem para os efeitos descritos acima. O primeiro é a teobromina, um vasodilatador que aumenta a quantidade de oxigênio e o fluxo de nutrientes para o cérebro e os músculos. Teofilina, o segundo metabólito, atua como relaxante da musculatura lisa, afetando os bronquíolos e aumentando a freqüência cardíaca. O terceiro metabólito é a paraxantina, responsável pelo aumento da lipólise, liberando glicerol e ácidos graxos no sangue para serem utilizados como fonte de energia pelos músculos.

Apesar desses efeitos prejudiciais à saúde, a cafeína é considerada como segura para a saúde pela FDA, desde 1958. Tanto a "American Medical Association" quanto a "American Cancer Society" apresentam declarações confirmando a segurança do consumo moderado de cafeína. Algumas observações sobre o consumo moderado de cafeína e saúde: bebidas que contêm cafeína são hidratantes; para crianças, a cafeína é segura e não causa hiperatividade; o consumo não afeta a chance de gravidez, é seguro durante a gestação e durante a amamentação; não é a causa nem piora osteoporose, não afeta o colesterol sanguíneo, não causa hipertensão crônica e não aumenta os riscos de doenças cardíacas (Fact Sheet: Caffeine and Health, 2007).

1.2.2. Ação em outros seres vivos

Diversos estudos foram realizados sobre a ação tóxica da cafeína em seres vivos.

Nathanson (1984) observou que concentrações de cafeína entre 0,68 % e 2,1 % de cafeína, relativas ao peso seco de folhas de chá e café, foram suficientes para matar a maior parte de larvas da lagarta de tabaco (*Manduca sexta*).

A atividade antifúngica da cafeína foi testada por Rizvi *et al.* (1980) em um experimento *in vitro* contra o fungo *Helminthosporium maydis*, um fungo parasita de milho, observando uma concentração inibitória mínima de 1500 ppm. Esses autores observaram também que submeter a cafeína à autoclave (1 bar, equivalente a aproximadamente 1 atm, por 15 min) não afeta a propriedade tóxica dessa

substância ao fungo. A cafeína também foi tóxica a outras 10 espécies de fungo, em concentrações variando de 2000 ppm a 4000 ppm.

Em 1999, Hewavitharanage *et al.* observaram que a cafeína inibiu a oviposição em besouros de *Xyleborus fornicatus*, retardou o aparecimento de diferentes fases do ciclo de vida, porém não apresentou efeito letal no inseto adulto.

Hollingsworth *et al.* (2003) demonstraram pela primeira vez o efeito moluscida da cafeína. Estes autores observaram que a cafeína é capaz de atuar tanto como repelente quanto como tóxico contra lesmas *Veronicella cubensis* e caracóis *Zonitoides arboreus*. Ao aplicar a cafeína em discos foliares, tanto as lesmas quanto os caracóis evitaram se alimentar desse material.

A cafeína é capaz de bloquear o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) (Laranja *et al.*, 2003), não havendo evidência de resistência desenvolvida pelo inseto ao longo das gerações submetidas ao tratamento. O uso de cafeína tem sido uma alternativa aos principais agentes de controle de *A. aegypti* atualmente usados, visto que o mosquito tem desenvolvido resistência a várias drogas tradicionalmente empregadas (Laranja *et al.*, 2006).

Avery *et al.* (2005) estudaram o efeito da cafeína contra pássaros que atacavam plantações de arroz. Os resultados indicaram a cafeína como um efetivo repelente contra essas aves, sendo um método econômico e ecologicamente seguro, pois possui baixa toxicidade aos pássaros.

A influência da cafeína no comportamento de saúvas também tem sido alvo de estudo. Mazzafera (1991) estudou a influência da cafeína no ataque de saúvas a cafeeiros. Esse autor observou que algumas espécies de *Coffea* em campo são susceptíveis ao ataque de saúva, enquanto outras não. Analisando o teor de cafeína nas folhas dessas espécies, Mazzafera detectou uma correlação negativa entre o teor de cafeína e a ocorrência de ataque pelas saúvas. Affonso (2002) estudou a importância de diferentes concentrações de cafeína no comportamento forrageiro de *Atta sexdens rubropilosa*. Observou que a cafeína foi dissuasora entre as concentrações de 0,7% até 0,015%, sendo notada atratividade a 0,01%.

2. OBJETIVOS

Na natureza, como mencionado anteriormente, as formigas cortadeiras desenvolveram um sistema de forrageamento que previne o excesso de exploração da vegetação próxima ao ninho, o que causaria a escassez desses recursos. A introdução da agricultura, que leva à homogeneidade da paisagem, afeta esse padrão. Este fato contribui muito ao *status* de praga associado às formigas cortadeiras (Cherrett, 1968; Haines, 1978).

Devido ao prejuízo causado à agricultura brasileira pela ação desses insetos, mas conhecendo-se a sua importância em ambientes naturais, é necessário um controle eficiente, que minimize os danos ecológicos causados pelo uso de inseticidas de origem sintética, os quais acabam agindo também contra outros seres, inclusive os benéficos.

Muitos estudos têm sido desenvolvidos utilizando metabólitos secundários de plantas como agentes tóxicos às formigas. O presente estudo tem por objetivo analisar a influência de diferentes concentrações de cafeína no crescimento *in vitro* do fungo mutualístico e na sobrevivência de saúvas operárias. Com essas informações, será possível observar o efeito da cafeína nesta relação mutualística entre as saúvas e o fungo, visando responder se a toxicidade é para o inseto, para o fungo ou para ambos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sauveiros

Os sauveiros (Figura 9) foram mantidos no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), alimentados com folhas de *Acalypha wilkesiana* Mull. Arg. (Malpighiales: Euphorbiaceae), flocos de aveia e quirera de milho, além de água. As condições de temperatura e umidade foram monitoradas com o auxílio de um termômetro de máxima e mínima, que verifica os extremos da temperatura, em uma escala que varia de -30 °C a 50 °C, num tempo definido pelo usuário, e de um higrômetro de bulbo seco e de bulbo úmido, que possui uma escala de -10 °C a 50 °C e uma tabela de conversão para porcentagem de saturação da umidade do ar. Atualmente, existem 16 sauveiros, sendo 5 de coleta realizada em Fevereiro de 2006, e 11 de coleta realizada em Fevereiro de 2007.

Figura 9: Imagens de 3 sauveiros mantidos em laboratório, aproximadamente 8 meses após a revoada

Fotos: C. H. Miyashira.

3.2. Isolamento do fungo e preparo da cultura inicial *in vitro*

Fragmentos do fungo dos sauveiros, juntamente com algumas saúvas, foram retirados das panelas de fungo e armazenados em potes estéreis para coleta de amostras clínicas previamente autoclavados a 120 ºC e 1,1 atm. Esse potes contendo o fungo foram transportados à Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica (IBt), onde pequenos fragmentos do fungo foram inoculados em placas-de-petri, contendo o meio de cultura denominado MEA LP (formulação, em g/L: 20 de extrato de malte; 5 de peptona bacteriológica; 2 de extrato de levedura e 20 de ágar). O fungo foi replicado para novas placas, contendo o meio MEA LP, sempre que necessário, para permitir o seu uso posterior.

Para verificar se o fungo cultivado nas placas-de-petri era o mesmo cultivado pelas saúvas, placas contendo o fungo cultivado *in vitro* foram fornecidas aos sauveiros, como já realizado por outros autores (Howard *et al.,* 1988; Cazin *et al.*, 1989). Uma outra metodologia utilizada para confirmar a identificação do fungo mutualista foi a prepararação de lâminas histológicas com fragmentos do fungo cultivado, seguida de observação em microscópio ótico, para observar a presença dos gongilídeos.

3.3. Seleção do meio de cultura para o ensaio de toxicidade

Duas formulações de meios de cultura foram testadas a fim de se determinar qual seria a adotada nos ensaios com o fungo. Um dos meios foi o MEA LP (já descrito no item anterior). O outro meio foi o denominado Pagnocca B por Silva-Pinhati *et al.* (2005), cuja formulação, em g/L, é a seguinte: 10 de extrato de malte, 2 de peptona bacteriológica, 17 de ágar, 10 de glicose, 2 de cloreto de sódio, 20 de caseína hidrolisada, 20 de flocos de soja, 20 de flocos de aveia, 3,8 de fosfato de sódio dibásico, 2,5 de ácido cítrico e 500mL de água destilada, com o pH final sendo ajustado para 5,0.

Cada meio de cultura foi preparado em frascos erlenmeyer com capacidade volumétrica de, no mínimo, duas vezes o volume relativo preparado. Os frascos contendo os meios de cultura e as placas-de-petri foram autoclavados a 120 °C e 1,1 atm de pressão, por 30 minutos. Depois foram colocados na câmara de fluxo

laminar, previamente esterilizada durante 20 minutos por luz ultravioleta, onde aproximadamente 15 mL de meio foram transferidos para cada placa-de-petri. Essas placas ficaram em repouso na câmara de fluxo sob luz ultravioleta até a solidificação do meio. Após a solidificação do meio-de-cultura, cada placa-de-petri foi inoculada com um disco de ágar de 5 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo proveniente da cultura inicial (ver item 3.2), colocado em posição central. As placas foram incubadas em estufas para B.O.D. na temperatura de 25 ºC (±1ºC).

Para efetuar as medidas de crescimento do fungo, foram traçadas duas retas perpendiculares com ponto de cruzamento coincidindo com o centro do disco do inóculo, formando quatro segmentos de reta partindo do ponto de cruzamento (Figura 10). As medidas foram realizadas a partir da borda do inóculo, até a extremidade do crescimento do fungo no meio de cultura. Para cada placa-de-petri, foram realizadas quatro mensurações em cada dia, uma em cada segmento. Dessa forma, ao final do ensaio, foi calculado o valor de raio médio do fungo para a cada placa-de-petri e para cada tratamento. O crescimento do fungo também foi expresso como a taxa de crescimento radial deste fungo por dia. Essas medidas são diferentes da realizada por Silva-Pinhati *et al.* (2005), que utilizaram produção de biomassa como medida de crescimento.

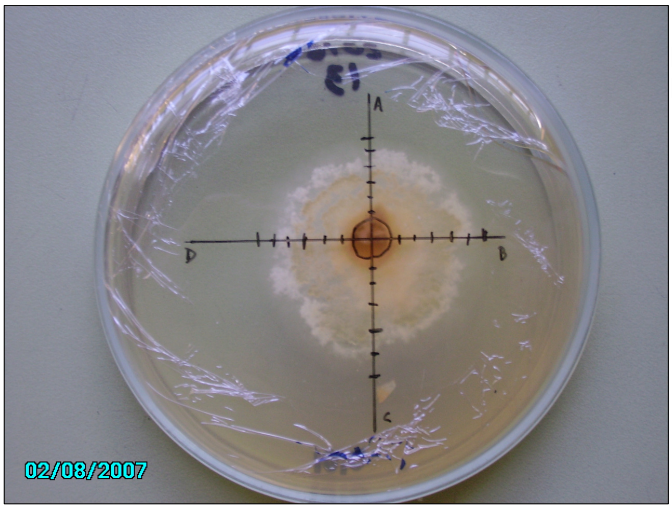


Figura 10: Vista da parte inferior da placa-de-petri, com o inóculo delimitado no centro da placa e os quatro segmentos de reta A, B, C e D. Em cada segmento há diversas marcações, referentes a cada dia de medição.
Foto: C. H. Miyashira

O ensaio foi realizado com fungos provenientes de oito sauveiros distintos (n=8), para os dois tipos de meios de cultura. Considerando o dia do inóculo como ponto de partida, as medidas foram feitas uma vez por semana, até o fungo de pelo menos uma das placas-de-petri alcançar a parede da placa, o que ocorreu na sétima semana. Os dados de taxa de crescimento radial foram submetidos ao teste T para verificar se as médias obtidas eram estatisticamente semelhantes.

3.4. Influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo mutualista

Para avaliar a influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo mutualista, foi feito um estudo de toxicidade, utilizando amostras de quinze sauveiros distintos. O meio de cultura utilizado foi o meio MEA LP. O experimento foi montado com a presença de cinco tratamentos: a situação controle e quatro concentrações de cafeína. As quatro concentrações que foram testadas são semelhantes às encontradas em folhas de *Coffea*, com base em dados de literatura (Mazzafera, 1991; Mazzafera & Magalhães, 1991): 0,01%, 0,05%, 0,10% e 0,50%, sendo as porcentagens relativas ao peso total do meio de cultura. A situação controle contém apenas o meio de cultura, sem a cafeína. A cafeína foi dissolvida na água destilada da própria formulação do meio de cultura.

Os processos de preparação dos meios de cultura, de esterilização, de inoculação, de incubação e de mensuração do fungo foram semelhantes aos utilizados no experimento de "Seleção do meio de cultura para o ensaio de toxicidade" (ver item 3.3).

Para esse ensaio, foram realizadas duas repetições. A primeira, denominada A1, foi realizada com o fungo de oito sauveiros distintos (n=8) e a segunda, denominada A2, o fungo de sete sauveiros distintos (n=7). Ambas as repetições foram realizadas durante oito semanas.

A hipótese testada foi de que há influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo. Esse crescimento foi avaliado pelo valor de raio médio final obtido para cada placa, em cada tratamento. Esses dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com fator único, uma vez que está sendo utilizada uma variável (a cafeína) para diferentes tratamentos. Por esta análise, foi observado se as diferenças obtidas entre as médias dos valores obtidos em cada tratamento foram devidas ao acaso ou também devidas aos fatores experimentais, no caso, as diferentes concentrações de cafeína. Quando necessário, os dados foram submetidos ao teste comparativo de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para identificar entre quais tratamentos a diferença entre as médias foi significativa.

3.5. Influência da cafeína na sobrevivência das formigas

A metodologia empregada foi semelhante àquela de Bueno *et al.* (1997) e Howard *et al.* (1988). Uma dieta sólida constituída por 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0,1 g de extrato de levedura, 1,5 g de ágar e 100 mL de água destilada foi preparada. A cafeína, quando necessária, foi dissolvida na água destilada.

Os ensaios foram conduzidos em placas-de-petri, para as quais os insetos eram transferidos. Cada placa recebeu um recipiente com a dieta sólida e um recipiente com algodão umedecido com 2 mL de água. Além disso, as placas foram forradas com papel de filtro umedecido com 1 mL de água destilada. Foram montados sete tratamentos, três controles (dieta sólida sem cafeína + água; somente a água; ausência de dieta e de água) e quatro com as dietas sólidas incorporadas com diferentes concentrações de cafeína (0,01%, 0,05%, 0,10% e 0,50%) + água. O emprego do termo "água" nos tratamentos refere-se à tampa com algodão umedecido com água. Os procedimentos de preparação e de esterilização da dieta foram semelhantes aos realizados para a preparação do meio de cultura (ver item 3.3).

Uma porção entre 0,4 e 0,5 g da dieta foi colocada em cada placa, de acordo com o tratamento. A dieta foi trocada diariamente, para evitar contaminação por microrganismos. Foram realizadas duas repetições, cada uma com 6 réplicas (n=6) para cada tratamento. O recipiente com algodão umedecido com água e o papel de filtro também foram trocados diariamente.

Foram colocadas 10 saúvas por placa-de-Petri, totalizando 60 saúvas para cada tratamento, em cada repetição. As saúvas foram coletadas aleatoriamente dos sauveiros mantidos em laboratório e transferidas para as placas-de-petri. As placas foram mantidas a 24 ºC e com umidade relativa de 70 %. A cada 24h foi verificado o número de formigas mortas por placa-de-petri.

Para a análise estatística, foi utilizado o dia em que 50% das saúvas das placas-de-petri morreram (M50). Esses dados foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA). Quando as diferenças entre os tratamentos foram detectadas, os dados foram submetidos ao teste de comparação de Tukey, a fim de identificar entre quais tratamentos a diferença foi significativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÂO

4.1. Coleta e manutenção dos sauveiros

Os procedimentos de coleta e manutenção dos sauveiros em laboratório ainda estão em desenvolvimento e são adaptados conforme a necessidade.

Anualmente, é realizada coleta de novos sauveiros com o intuito de manter uma quantidade razoável, suficiente para a realização dos experimentos. Para a coleta dos sauveiros, foi utilizada a metodologia já realizada por outros pesquisadores do laboratório, sendo realizadas algumas adaptações. Essa coleta é realizada no mês de Fevereiro, aproximadamente quatro meses após a revoada, quando o sauveiro possui apenas uma panela de fungo e algumas dezenas de saúvas.

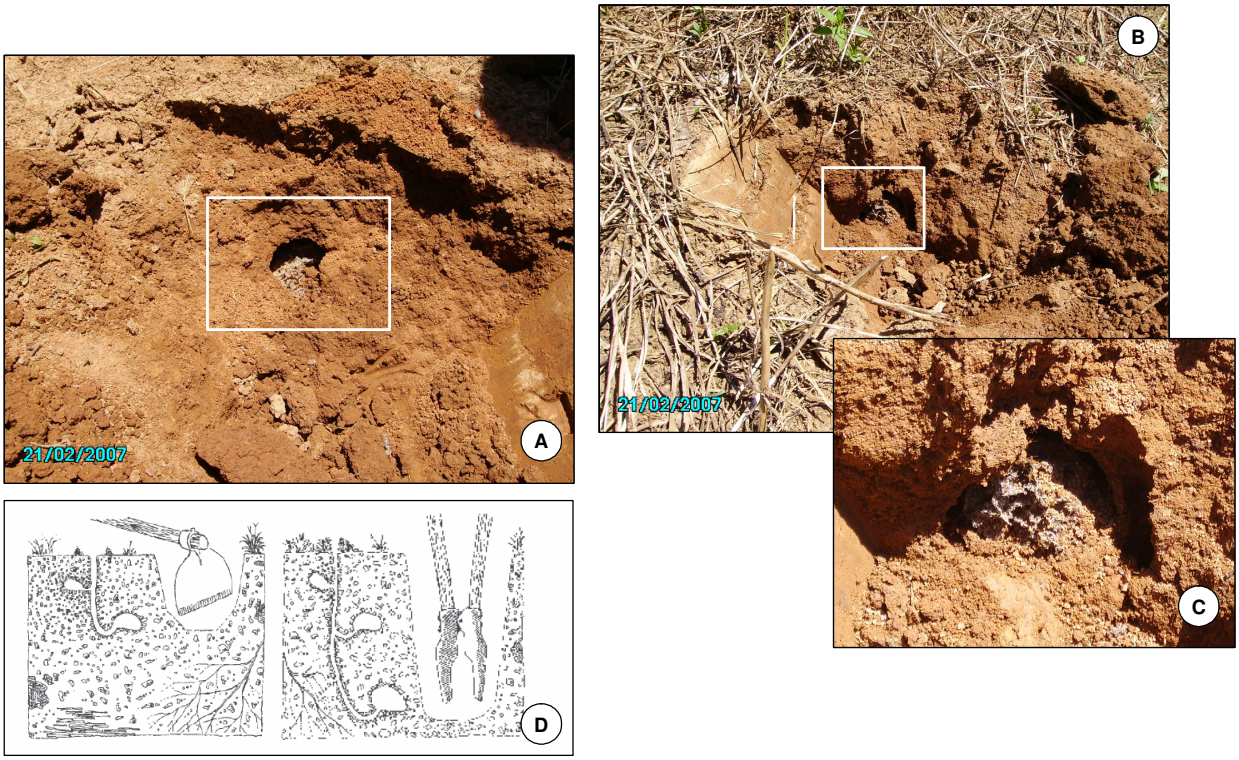


Figura 10: A e B: Visualização da panela de dois sauveiros após escavar paralelamente ao sauveiro, aproximadamente 10 cm de profundidade, com o retângulo demarcando a região da panela de fungo. C: Imagem ampliada da área delimitada pelo retângulo da figura B, para a visualização do fungo no interior da panela. D: Desenho esquemático demonstrando como é realizada a escavação para coleta dos sauveiros. Fotos: C. S. S. Adania.

O sauveiro é localizado no campo devido à característica do olheiro citada anteriormente (ver item 1.1.1, Figura 4II). Após a escavação de, aproximadamente, 10 cm de profundidade do solo, é encontrada a panela de fungo do sauveiro, contendo também a rainha (Figura 11). Durante a coleta, cada sauveiro é armazenado em um pote plástico de 2,1L contendo gesso em sua base e na tampa, e um orifício tampado em sua parede. O gesso na base do pote tem a função de absorver o excesso de água que se forma devido à condensação. Na tampa, um buraco é feito e o gesso é colocado, permitindo que esse gesso fique em contato com o interior do pote e com o ambiente exterior. Assim, é possível manter elevada a umidade do pote umedecendo esse gesso da tampa.

Ao ser trazido ao laboratório, cada pote é alojado em uma bandeja plástica, com talco previamente colocado para evitar a fuga das saúvas, e possui seu orifício aberto para permitir a saída das saúvas para a bandeja, que se tornará seu local de forrageamento e de depósito de lixo. Quando o fungo cultivado ocupa quase que totalmente o pote, o sauveiro é transferido para uma bandeja maior e um segundo pote plástico é colocado, para que uma segunda panela de fungo seja inicializada.

Inicialmente, houve certa dificuldade para a manutenção dos sauveiros em laboratório, pois a criação de um ambiente semelhante ao encontrado "*in vivo*" é muito difícil, devido às variações de temperatura, umidade e luminosidade serem diferentes das encontradas no solo de um ambiente ao ar livre.

Métodos de manutenção de sauveiros em condições artificiais desenvolvidos por outros pesquisadores, não foram eficazes pelo fato deles serem específicos a certas situações laboratoriais, diferentes das encontradas em nosso laboratório. Por isso, foi feita uma adaptação de acordo com a observação dos procedimentos que demonstravam melhores respostas de crescimento do sauveiro como um todo (crescimento do fungo e quantidade de saúvas). Assim, foi definido que a temperatura da sala deve estar acima de 20 °C e abaixo de 30 °C, com a umidade do ar acima de 70 % e luminosidade natural, proveniente do exterior, controlada com a finalidade de evitar que raios solares incidam diretamente na panela de fungo dos sauveiros. A luminosidade artificial, proveniente de lâmpadas fluorescentes, não foi controlada em um ciclo de claro e escuro. A temperatura foi mantida dentro desse intervalo estabelecido com o auxílio de um aquecedor elétrico e de um condicionador de ar. A umidade foi mantida acima de 70 % com a ebulição da água armazenada em uma panela, mantida sob uma chapa aquecedora elétrica. É

importante ressaltar que para o fungo mutualista das saúvas, a temperatura ideal para o crescimento é de 24 ºC (Cazin *et al.* 1989). Em relação à umidade, o fungo mutualista não difere da grande maioria de fungos que, de um modo geral, não possuem a habilidade de crescer em ambientes com umidade baixa, sendo a base para a existência de métodos tradicionais de preservação de comida, como a desidratação ou a adição de sal ou açúcar (Carlile & Watkinson, 1995).

Em relação ao material vegetal fornecido aos sauveiros, inicialmente consistia de folhas de *Acalypha wilkesiana* (Magnoliales, Euphorbiaceae), flocos de aveia e quirera de milho. Também foi fornecida água, por meio de algodão umedecido ou colocada diretamente na bandeja, quando a umidade era baixa e a temperatura alta. Durante o período de outono e inverno, também foram fornecidos materiais vegetais provenientes de *Rosa* spp. (Rosales: Rosaceae) e de *Malvaviscus arboreus* (Malvales: Malvaceae) para não causar uma exploração excessiva dos indivíduos de *A. wilkesiana*.

4.2. Isolamento e manutenção do fungo

O isolamento e a manutenção *in vitro* do fungo mutualista das saúvas apresentam grande dificuldade, pelo fato de haver outros microrganismos (outros fungos, bactérias e leveduras – ver Introdução) no ambiente em que o fungo cresce naturalmente (Craven *et al.*, 1970), que desempenham papel importante nesse sistema saúva-fungo. Além disso, o fungo mutualista apresenta um lento crescimento em meio de cultura, o que leva a um maior tempo de incubação, aumentando os riscos de contaminantes. Além disso, pode ocorrer também o problema de perda de água do meio de cultura, podendo influir no desenvolvimento do fungo. Para o isolamento, algumas metodologias já foram descritas visando facilitar esse processo ao diminuir a ocorrência de contaminantes e permitir um crescimento mais rápido do fungo.

Cazin *et al.* (1989) realizaram sucessivas lavagens do fungo com água destilada. Em cada lavagem, 10mL de água destilada foram acrescentados a uma porção do micélio do fungo em um tubo de ensaio, seguido por agitação e centrifugação. Os sobrenadantes foram coletados e a lavagem foi repetida cinco

vezes. Ao final desse processo, partículas do fungo foram inoculadas em meio-de-cultura, o que permitiu o cultivo *in vitro* apenas do fungo mutualista.

Pagnocca *et al.* (1996) isoloram o fungo de um sauveiro e transferiram para placas-de-petri contendo o meio “Sabouraud agar”, suplementado com 200mg/L de cloranfenicol e pH ajustado para 4,0 com HCl 1N, obtendo sucesso no isolamento e cultivo do fungo mutualista para experimentos de toxicidade do fungo.

Silva-Pinhati *et al.* (2005) isolaram fragmentos do fungo contendo saúvas, incubado-os em placas-de-petri por 10 a 20 dias, a 25 ºC e 80 % de umidade, no escuro. Esses autores ressaltaram que a eficiência do isolamento aumentou com a utilização dessa metodologia, pois as saúvas continuavam a limpar o fungo como no sauveiro.

Nas primeiras tentativas de obter uma cultura pura do fungo mutualista neste trabalho, o fungo foi coletado dos sauveiros e as saúvas retiradas. Apenas o fungo foi armazenado em potes, previamente esterilizados, e transportados ao Instituto de Botânica, onde foi feita a inoculação em meio MEA LP. Entretanto, por essa metodologia, microrganismos contaminantes sempre cresciam nas placas (Figura 12).

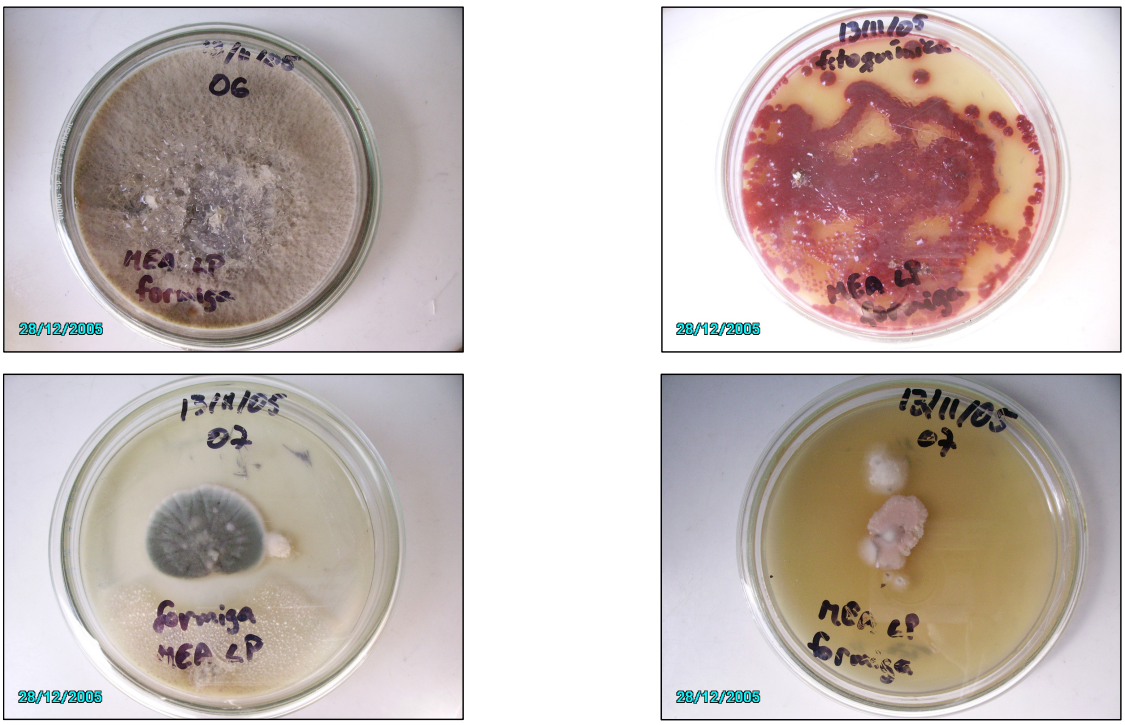


Figura 12: Fungos e/ou bactérias considerados contaminantes, de diversos aspectos, crescendo no meio de cultura, em placas-de-petri de 10 cm de diâmetro. Fotos: C. H. Miyashira

Para tentar diminuir a ocorrência de contaminação, as saúvas deixaram de ser retiradas após a coleta, sendo transportadas juntamente com o fungo. Apenas durante o processo de inoculação, realizada em câmara de fluxo laminar, que o fungo era separado das saúvas e transferido para o meio de cultura.

Numa primeira tentativa por essa nova metodologia, a coleta foi feita em 10 sauveiros, aparecendo contaminantes em quatro culturas, sendo necessário coletar novamente o fungo desses quatro sauveiros. Após essa segunda coleta, nove matrizes foram formadas com sucesso, sem a presença de contaminantes. Numa segunda tentativa realizada foram coletados fungos de 23 novos sauveiros, obtendo-se sucesso no isolamento do fungo de 10 deles. A seguir, numa nova coleta, foram coletados fungos dos 13 sauveiros em que a cultura apresentou contaminantes, obtendo-se sucesso no isolamento de nove fungos, totalizando 19 matrizes.

A coleta do fungo com as saúvas possibilitou um isolamento mais eficiente, quando comparado à coleta sem as saúvas. Isso se deve ao fato das saúvas realizarem um constante processo de limpeza do fungo, afastando e até eliminando outros microrganismos. Essa proteção realizada ao fungo acontece de diversas formas: através de antibióticos das glândulas metapleurais e mandibulares; por substâncias produzidas por uma bactéria do gênero *Pseudonocardia,* específica para o controle do fungo parasita do gênero *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999; Cafaro & Currie, 2005), que fica no corpo da formiga; remoção de substratos infectados (“weeding”) e utilizando movimentos de varredura (“grooming”). Alguns autores ressaltam que a presença da bactéria *Pseudonocardia* revela que a relação mutualística é na verdade entre esses três organismos, o fungo, a saúva e a bactéria, e não apenas entre o fungo e a saúva (Curr ie *et al.*, 1999).

A confirmação do fungo isolado em meio de cultura como sendo o mesmo cultivado pelas saúvas foi realizada fornecendo placas contendo o fungo crescido sobre o meio de cultura aos sauveiros (Figura 13). Foram fornecidas três placas para diferentes sauveiros. As saúvas coletaram o fungo das três placas, consumindo-o ou incorporando-o ao fungo cultivado no sauveiro. Esse processo já havia sido descrito por outros autores, os quais observaram também que a presença de um fungo estranho na cultura *in vitro* leva as formigas a rejeitarem o fungo ou mesmo transportá-lo diretamente para a panela de lixo (Howard *et al.,* 1988, Cazin *et al.*, 1989). Além desse procedimento, lâminas histológicas foram montadas para verificar a existência dos gongilídeos no fungo cultivado nas placas-de-petri (Figura 14).

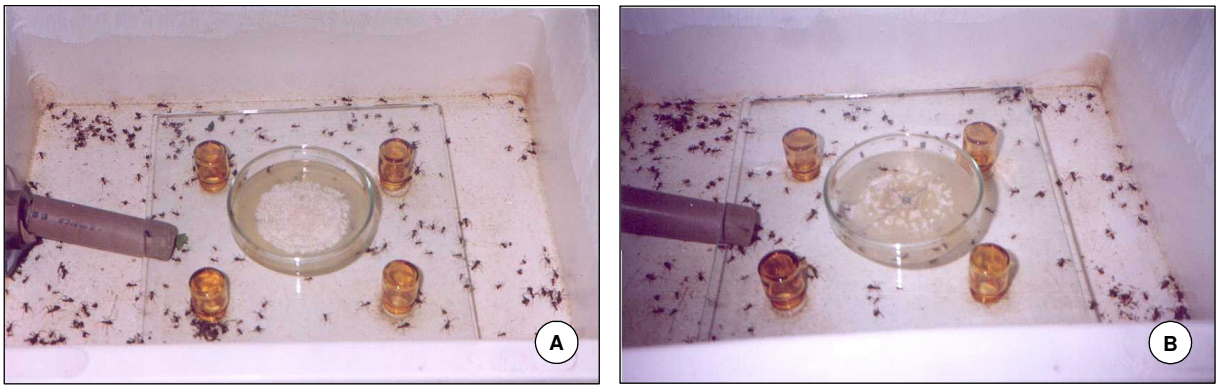


Figura 13: A: Placa-de-petri fornecida a um sauveiro, contendo o fungo mutualista das saúvas, crescido sobre meio de cultura. B: A mesma placa-de-petri após 24 horas. O fungo foi coletado e incorporado ao fungo do sauveiro. Fotos: C. H. Miyashira.

Uma vez que somente o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras possui gongilídeos, é fácil a comprovação de que o fungo cultivado em placa é o mesmo cultivado pelas saúvas. Conhecendo a aparência do fungo e suas características de crescimento, não foi mais necessário repetir esse teste com cada um dos novos isolados. O fungo mutualista das saúvas apresenta pequenas granulações brancas sobre o micélio branco que auxilia na sua identificação em cultura (Figura 15).

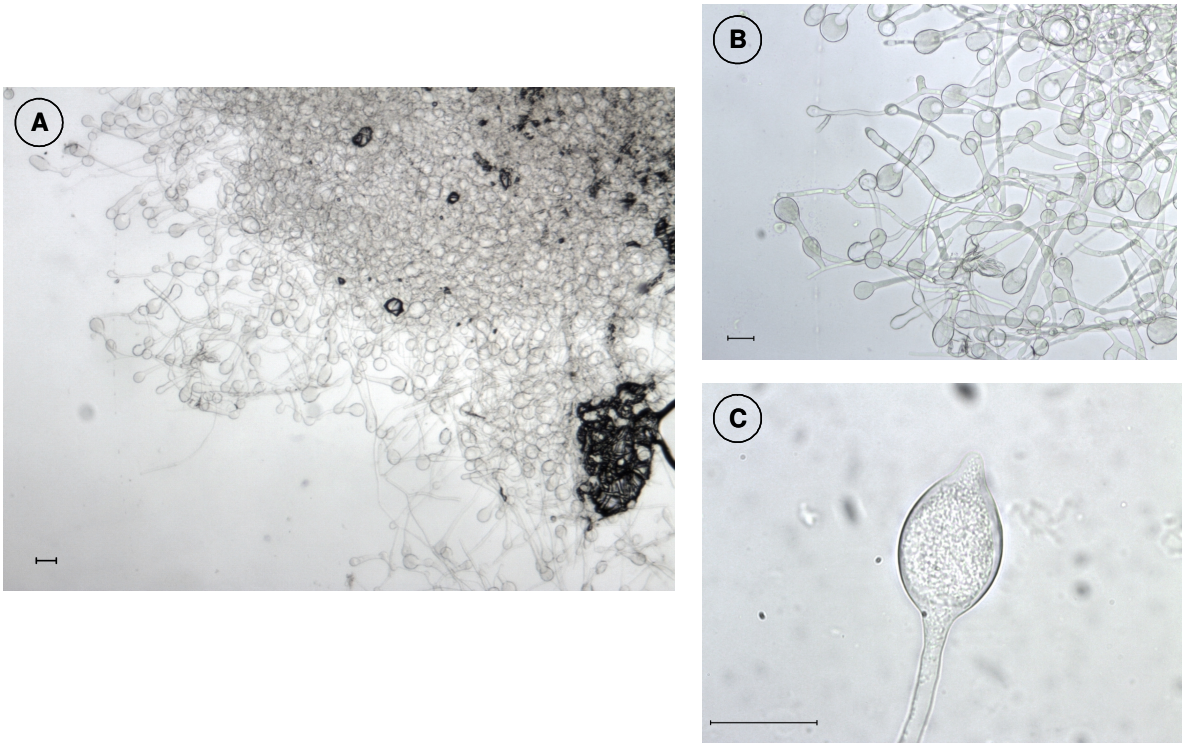


Figura 14: Imagens, obtidas por meio de microscopia óptica, de gongilídeos obtidos de fungos cultivados *in vitro*. A: aumento de 40x; B: aumento de 100x; C: aumento de 400x. A barra corresponde a 40 µm.
Fotos: A. M. Gugliotta.

A manutenção das culturas *in vitro* foi realizada replicando o fungo mutualista em novas placas contendo o meio MEA LP. Essa replicação foi realizada quando o meio de cultura começava a diminuir de tamanho devido à perda de água ou começava a escurecer, e/ou quando ocorria o aparecimento de um contaminante. A replicação geralmente ocorria após oito semanas, a não ser nos casos de ocorrência de contaminação, em que era realizada uma replicação assim que o contaminante fosse observado.

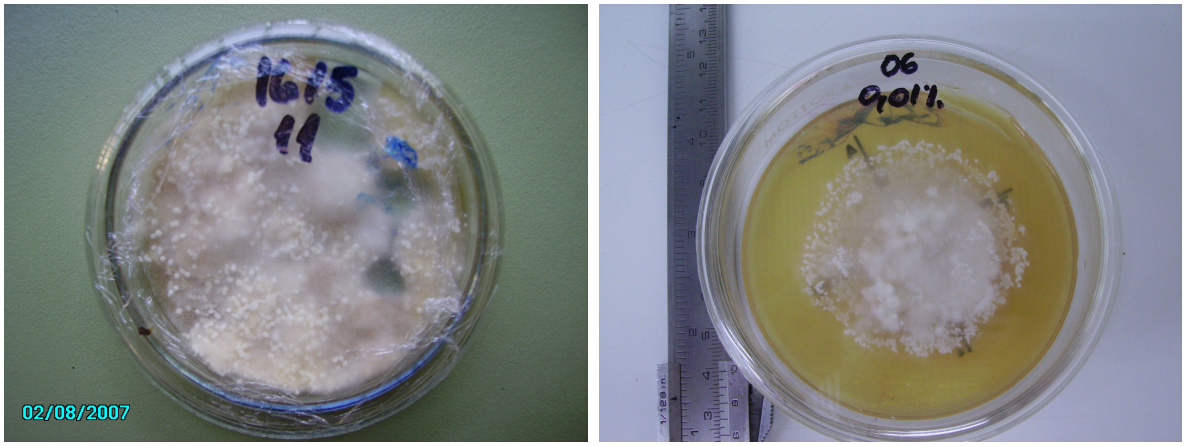


Figura 15: Placas-de-petri contendo o fungo mutualista. Observa-se as granulações brancas sobre o micélio branco, característico do fungo cultivado pelas saúvas. Fotos: C. H. Miyashira.

4.3. Seleção do Meio de Cultura

O experimento foi realizado por sete semanas. Os dados de média dos raios para cada meio de cultura estão expressos na Figura 16. É possível observar que raios médios relativos ao crescimento do fungo nos dois meios foram aparentemente semelhantes durante todo o experimento. Ao final do experimento, foi calculado o valor médio da taxa de crescimento radial por dia e o valor de desvio padrão (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxa de crescimento radial (mm/dia) e desvio padrão para os fungos cultivados no meios MEA LP e Pagnocca B (n=8)

	taxa média (mm/dia)	desvio padrão
MEA LP	0,515	0,096
Pagnocca B	0,440	0,121

Com os dados de taxa de crescimento radial para cada meio de cultura (n=8), foi realizada a análise estatística aplicando o teste T. Por esse teste, foi obtido o valor para T de 1,381 e um valor de Tcrítico de 1,7613 (α=0,05). Como o valor de T é menor que o de Tcrítico, os valores obtidos para taxa de crescimento radial são estatisticamente iguais para os dois meios de cultura.

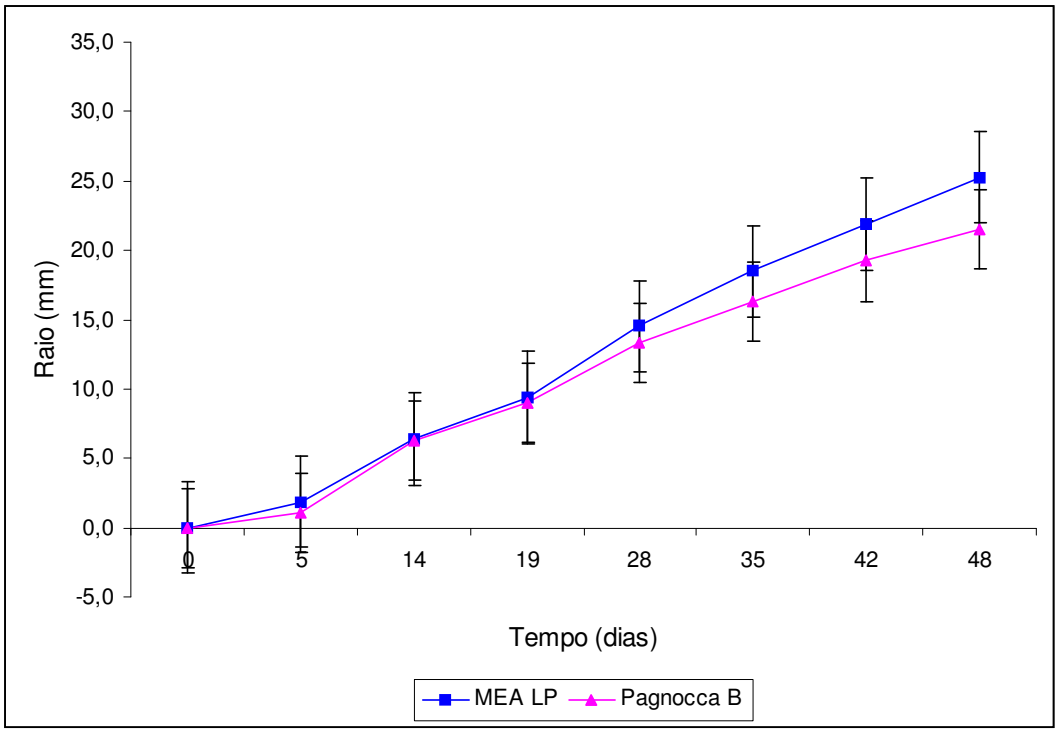


Figura 16: Gráfico referente às medidas de raio médio ao longo do tempo do fungo utualista, para os meios MEA LP e Pagnocca B (n=8). As barras correspondem aos valores de erro padrão.

Visto que a taxa de crescimento do fungo não apresenta diferença entre os dois meios de cultura testados, o meio MEA LP foi escolhido para realização do ensaio com a cafeína, pois possui uma formulação mais simplificada e é mais transparente, o que facilita a mensuração utilizando a metodologia descrita nesse trabalho.

Não foi possível continuar a coleta dos dados após os 49 dias de experimento, pois o fungo começou a apresentar algumas mudanças morfológicas, como alteração da cor e secreção de exsudatos, o que poderia influir no crescimento horizontal. Após esse período, também foram observadas rachaduras ou diminuição nos meios de cultura de algumas placas, indicando perda de água. A mudança nas características do meio poderia influenciar a taxa de crescimento do fungo e, conseqüentemente, os valores de medidas poderiam estar incorretos.

De um modo geral, é possível afirmar que o fungo mutualista das saúvas apresenta um crescimento *in vitro* muito lento, sendo um fator limitante durante os ensaios, pois aumentam os riscos de contaminação da cultura e de mudanças nas características do meio.

Trabalhos anteriores tiveram como objetivo acelerar o crescimento do fungo, ressaltando essa dificuldade de medida de crescimento do fungo relacionada ao seu crescimento lento. Cazin *et al.* (1989), comparando diferentes temperaturas, observaram melhor taxa de crescimento a 24 ºC, quando comparado a 30 ºC e 37 ºC. Os trabalhos de Pagnocca *et al.* (1990, 1996) e Godoy *et al.* (2005) tiveram como objetivo diminuir o tempo de experimento cultivando o fungo por até 35 dias, utilizando o mesmo meio de cultura, o qual consistia de glicose, cloreto de sódio, bacto-peptona, extrato de malte e ágar, sendo muito semelhante ao MEA LP utilizado neste trabalho. Em relação ao trabalho de Silva-Pinhati *et al.* (2005), o qual foi utilizado o meio Pagnocca B, o experimento foi realizado por 30 dias. Entretanto, não é possível afirmar que o meio de cultura MEA LP seja melhor em relação ao tempo de meios utilizados nos outros trabalhos, pois não é citado nenhum motivo dos experimentos terem sido parados em tais períodos.

A mensuração do crescimento radial, utilizada neste trabalho, leva em consideração o crescimento horizontal alcançado pelo fungo, sobre o meio de cultura. Entretanto, o fungo também apresenta crescimento vertical e aumento da densidade, características que não foram mensuradas por essa metodologia.

A forma de realização dessas medidas de crescimento é bastante variável na literatura. Alguns autores fazem essa quantificação atribuindo valores empíricos de acordo com observações visuais (Howard *et al.*, 1988; Pagnocca *et al.*, 1990), ou porcentagem relativa de crescimento em relação à situação controle (Pagnocca *et al.* 1996; Monteiro *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2005).

Dessa forma, nossos resultados relativos à taxa de crescimento do fungo podem estar um pouco subestimados, visto não considerarmos seu crescimento vertical. Entretanto, o cuidado na padronização das medidas e no número de réplicas não invalida as conclusões observadas. A metodologia empregada é bastante fácil de ser empregada e fornece dados com unidades de medidas que podem ser diretamente comparados a outros trabalhos.

4.4. Influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo mutualista

A Figura 17 mostra as placas-de-petri de três amostras da repetição A1 ao final do experimento, após 56 dias de incubação. Os valores de raio médio para cada tratamento ao longo do tempo, das duas repetições (A1 e A2) do ensaio de toxicidade ao fungo, estão representados nos gráficos da Figura 18. Na Tabela 2 estão expressas as taxas de crescimento radial médias para as repetições A1 e A2 calculadas no final do experimento. Por esses resultados, foi possível observar que quanto maior a concentração de cafeína, menor a taxa de crescimento radial do fungo. Em todas as placas com meio de cultura contendo 0,50% de cafeína e em algumas contendo 0,10% de cafeína, o fungo do inóculo morreu. Nas placas com 0,10% de cafeína em que o inóculo não morreu, o crescimento foi altamente comprometido (Figura 17). Para a concentração de 0,05% há um crescimento intermediário e para a concentração de 0,01%, praticamente não há alteração no crescimento quando comparado ao controle (Figura 18).

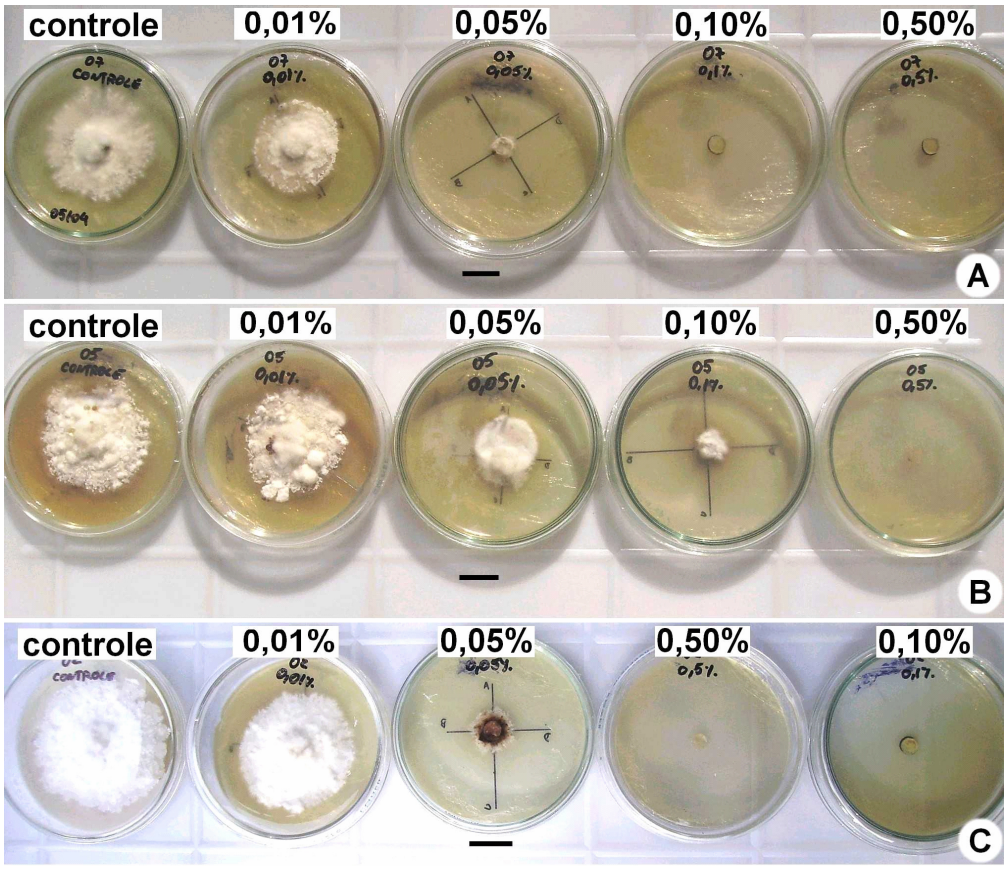


Figura 17: Placas-de-petri ao final do ensaio de toxicidade do fungo, com as concentrações de cafeína indicadas na figura. Observa-se que quanto maior a concentração, menor o crescimento radial do fungo mutualista. A: Fungos da amostra 07. B: Fungos da amostra 05. C: Fungos da amostra 02. A barra equivale a 2cm. Fotos: C. H. Miyashira.

Tabela 2 - Taxas de crescimento radial (mm/dia) e desvio padrão do fungo cultivado em placa-de-petri, de acordo com o tratamento submetido

repetição	n (amostras)		controle	0,01%	0,05%	0,10%	0,50%
A1	8	taxa	0,426	0,425	0,156	0,045	0,000
		desvio padrão	0,190	0,081	0,116	0,055	0,000
A2	7	taxa	0,493	0,483	0,224	0,044	0,000
		desvio padrão	0,114	0,072	0,063	0,021	0,000

De acordo com o gráfico da Figura 18, foi observado que há um retardamento no crescimento do fungo nas concentrações de 0,05% e 0,10%, para a repetição A1, e na concentração de 0,10% para a repetição A2. No primeiro caso, o fungo mantido em meio de cultura contendo 0,05% de cafeína sofreu um atraso no crescimento de sete dias, enquanto que na concentração de 0,10%, o fungo começou a crescer apenas a partir do dia 21. Na segunda repetição (A2), o fungo mantido no meio de cultura contendo 0,10% de cafeína sofreu um atraso de sete dias para iniciar o crescimento. Esse atraso no crescimento pode ser causado pelo fato da cafeína ser tóxica ao fungo e este precisar de um tempo maior para degradá-la. Para se alimentarem, os fungos secretam enzimas digestivas sobre o material, absorvendo depois os produtos solúveis decorrentes da digestão extracelular.

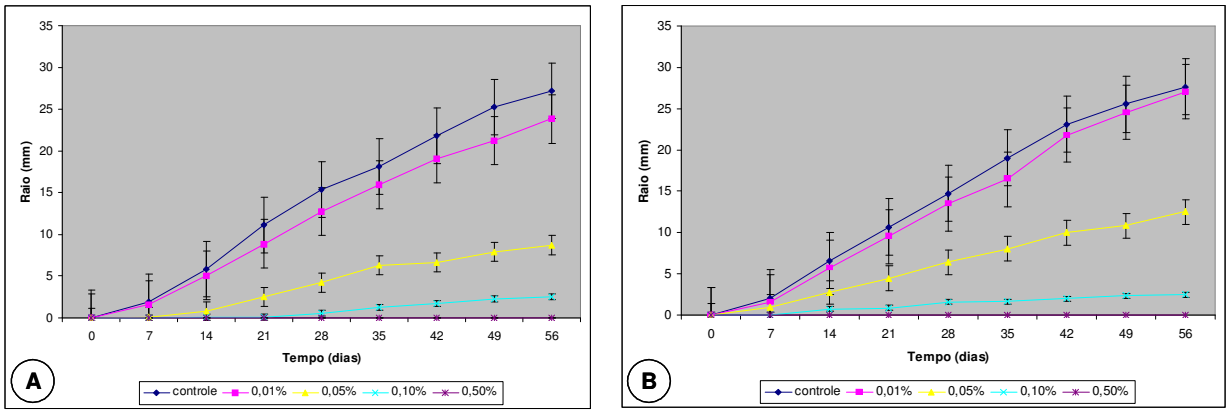


Figura 18: Gráficos referentes aos ensaios de crescimento do fungo, com o efeito das diferentes concentrações de cafeína no raio médio (em mm, a partir da borda do inóculo) do fungo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa*. As barras correspondem aos valores de erro padrão. A: ensaio A1 (n=8) e B: ensaio A2 (n=7).

Segundo a revisão feita por Dash & Gummadi (2006), alguns microrganismos possuem enzimas capazes de digerir a cafeína, através de uma rota de desmetilação. O principal metabólito formado pela degradação da cafeína por fungos

é a teofilina, enquanto que por bactérias, a teobromina é o principal metabólito formado. A conversão da cafeína a esses metabólitos é feita principalmente por N-desmetilases, cafeína oxidase e xantina oxidase. É possível que o fungo mutualista das saúvas possua algum tipo de enzima capaz de degradar a cafeína, justificando o atraso no crescimento. Esse tempo após o contato com a substância seria para degradar a cafeína, provocando a diminuição da concentração dela no meio, até alcançar um nível menos tóxico para o crescimento do fungo. É importante ressaltar que a teobromina e a teofilina também são metabólitos secundários de vegetais e possuem algumas funções semelhantes à da cafeína, entretanto, nenhum estudo ainda foi realizado para verificar a influência desses metabólitos no crescimento *in vitro* do fungo mutualista.

Tabela 3 – Valores do teste estatístico ANOVA para o ensaio de crescimento do fungo em meios contendo diferentes concentrações de cafeína, obtidos com os dados de raio médio final do fungo, para as duas repetições

repetição	n (amostras)	F	F crítico	valor de P
A1	8	58,5267	2,6787	5,2485E-14
A2	7	84,8465	2,6896	6,52136E-16

As medidas de raio médio final feitas semanalmente foram submetidas à ANOVA, para as duas repetições. Ao submeter esses dados de raio médio à ANOVA com fator único, foi obtido um valor de F > Fcrítico, para as duas repetições (Tabela 3). Esses valores revelam uma diferença estatística nos valores de raio médio final devido não apenas ao acaso, mas também aos tratamentos, ou seja, às concentrações de cafeína. Então, os dados de cada repetição foram submetidos ao teste comparativo de Tukey. Observa-se que os dados são estatisticamente semelhantes (P>0,05) entre o controle e a concentração de 0,01% e entre 0,10% e 0,50%. As medidas no meio com concentração de cafeína de 0,05% apresentaram valores significativamente distintos de qualquer outra concentração testada.

Foi observado que desde a primeira semana após o início do ensaio, já existem diferenças estatisticamente significativas entre os crescimentos radiais devido à presença da cafeína (F>Fcrítico) (Figura 19). A seguir, submetendo os dados de cada semana ao teste comparativo de Tukey, observou-se que, desde a primeira semana até a última (oitava semana), o crescimento é igual entre o meio controle e o

meio com 0,01%, e entre 0,10% e 0,50%, confirmando os dados obtidos ao final do experimento, para as duas repetições. O resultado obtido por essa análise reforça a idéia de que quanto maior a concentração de cafeína, menor é o crescimento do fungo, pois não há uma alteração no padrão de crescimento do fungo em qualquer período.

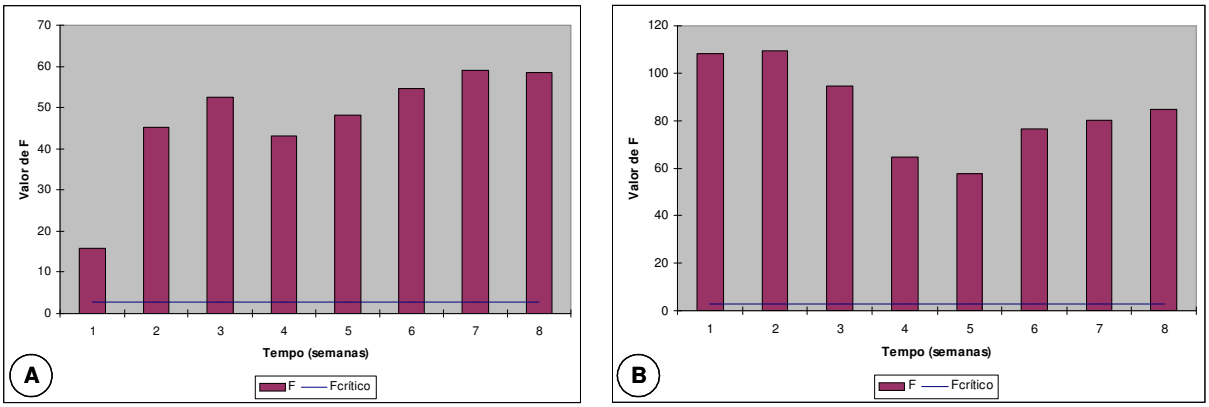


Figura 19: Valores de F obtidos para cada semana, na comparação entre os raios médio finais do fungo em meios com diferentes concentrações de cafeína. O valor de Fcrítico é o mesmo para todos os dias. A: repetição A1; B: repetição A2.

Outra análise realizada foi verificar se a variação dos dados obtida na repetição A1 é semelhante à variação obtida na repetição A2. Para realizar essa comparação, os dados de cada tratamento foram unidos numa mesma tabela, havendo no total 10 tratamentos: os dois controles (um de cada repetição) e as oito concentrações de cafeína (quatro de cada repetição). Foi realizada a ANOVA, obtendo um valor de F (60,0859) > Fcrítico (2,0400), para um valor de P igual a 1,1E-26. A seguir, pelo teste comparativo de Tukey, foi confirmado que as variações obtidas em cada tratamento de uma repetição são semelhantes às variações obtidas nos tratamentos da outra repetição. Assim, pode-se juntar os dados das duas repetições numa só tabela, obtendo um tamanho amostral igual a 15 (n=15). Nessas condições, foi obtido no ANOVA, um valor de F (133,6437) > Fcrítico (2,51304), para um valor de P igual a 1,31E-30, confirmando as observações já feitas para as repetições separadamente.

Todos esses dados e análises estatísticas possibilitaram a visualização de três padrões de crescimento do fungo em função da concentração de cafeína no meio de cultura. O primeiro é a ausência de efeito quando a concentração de cafeína é baixa

(0,01%), sendo o crescimento do fungo semelhante à situação controle, ou seja, ausência de cafeína. O segundo é uma diminuição do crescimento do fungo em concentração intermediária (0,05%). O terceiro é o baixo crescimento do fungo, ou praticamente ausência de crescimento, em condições de elevadas concentrações de cafeína (0,10% e 0,50%).

O resultado obtido coincide com as observações feitas por Affonso (2002) em ensaios de forrageamento. Esse autor observou que a concentração mais baixa de cafeína (0,01%) não causou inibição da coleta pelas saúvas de flocos impregnados, enquanto nas demais concentrações (0,015% a 0,7%), a coleta de flocos foi inibida.

Metabólitos secundários presentes nas plantas podem possuir ação repelente, indicando um potencial perigo para as saúvas. Esses metabólitos podem causar diretamente a morte das saúvas através da ingestão, ou indiretamente, ao reduzir o tamanho do fungo mutualista. Diminuir o fungo mutualista provoca a falta de nutrientes para as larvas, pois como já mencionado, o fungo é a sua única fonte de nutrientes (Quinlan & Cherrett, 1979). A consequência desse fenômeno pode ser a extinção do sauveiro, como foi observado por Mullenax (1979).

A ação desses metabólitos e o dano que podem causar ao fungo mutualista podem explicar um dos aspectos da relação trófica entre as plantas e as formigas cortadeiras. Rockwood (1976) sugeriu que a seleção de plantas forrageadas pelas formigas cortadeiras envolve uma maximização do conteúdo nutricional e uma minimização de efeitos prejudiciais ao fungo. A presença de um atrativo ou substância estimulante pode enganar a ocorrência de possíveis repelentes, como ocorre com o *Sesamun indicum* (Pagnocca *et al.*, 1990).

Portanto, com os dados obtidos da influência da cafeína no crescimento *in vitro* do fungo, podemos sugerir que a seleção das diferentes espécies de *Coffea* pelas saúvas *Atta sexdens rubropilosa,* observada por Mazzafera (1991 – ver item 1.2.2.), seja devida à toxicidade da cafeína ao crescimento do fungo, porém não se pode descartar a possibilidade de efeito tóxico direto ao inseto. Assim, com nossos resultados, podemos sugerir o uso da cafeína fosse utilizada como fungicida incorporada em iscas. Assim, a cafeína seria misturada a um suporte sólido atrativo para as saúvas e colocadas no olho do sauveiro ou nas trilhas. Dessa forma, no processo de forrageamento seriam levadas ao interior do sauveiro e provocariam a morte ou a redução do fungo e, conseqüentemente, a morte do sauveiro.

4.5. Influência da cafeína na sobrevivência das saúvas

Foram realizadas duas repetições (B1 e B2) nesse ensaio. Na Tabela 6 e na Figura 20 estão expressos os valores médios de M50, ou seja, o dia em que a mortalidade das saúvas foi de 50%. Os valores correspondem à média das seis réplicas (ver item 3.3 - Material e Métodos).

Cada repetição foi analisada separadamente, isso porque foram realizadas em épocas diferentes. Os resultados obtidos na análise de variância mostraram que existe diferença significativa entre os valores observados (F>Fcrítico) (Tabela 6), nas duas repetições.

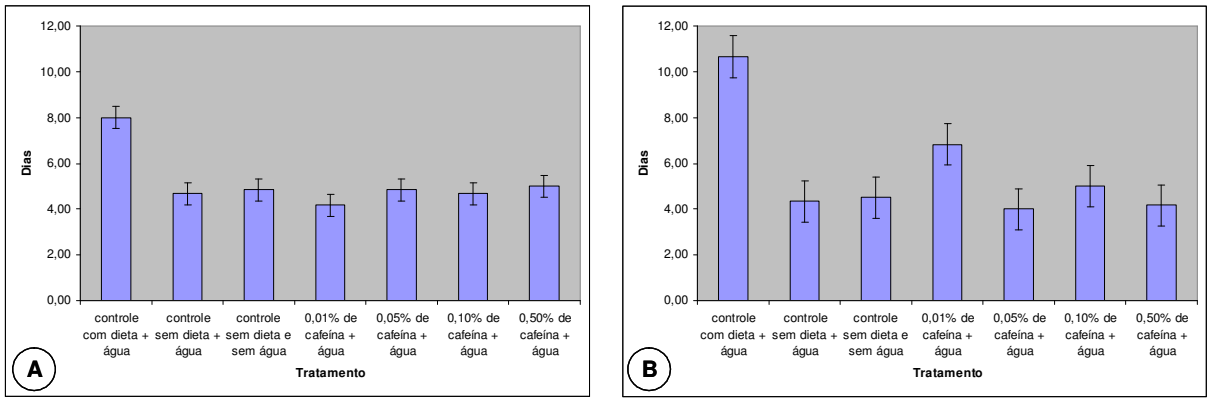


Figura 20: Gráfico demonstrativo dos valores médios de dias em que 50% das saúvas morreram (M50), para o ensaio de ingestão de dieta contendo diferentes concentrações de cafeína. A: repetição B1; B: repetição B2.

Tabela 6: Valores de F e Fcrítico obtidos do ensaio por ingestão de dieta, após submeter os dados em que ocorreu a morte de 50% das saúvas para os diferentes tratamentos, para cada repetição (B1 e B2)

	n (amostras)	F	F crítico	valor de P
B1	6	12,597137	2,3717845	1,6E-07
B2	6	19,793351	2,3717845	6,267E-10

Dessa forma, o teste de Tukey foi realizado para cada repetição (B1 e B2), visando verificar entre quais tratamentos havia diferença (Tabela 7). As situações controles apresentaram resultados iguais quando observadas as duas repetições. Pelos dados obtidos é possível observar que o valor da média para M50 da situação controle foi o maior entre todos os tratamentos nas duas repetições (B1 e B2), respectivamente 8,00 e 10,67, mostrando que as saúvas sobreviveram por mais tempo quando a dieta sem cafeína e a tampa com algodão e água foram fornecidas.

O algodão com água foi um fator que não influiu no aumento da sobrevivência das saúvas. Os valores de M50 para o controle sem água e sem dieta (4,83 e 4,50) e o controle com água e sem dieta (4,67 e 4,33) foram os mesmos.

Entre os tratamentos com cafeína na dieta, não houve uma grande variação no valor médio de M50, independente da concentração. Entretanto, observa-se que cada repetição teve um comportamento diferente. Para a repetição B1, os tratamentos com cafeína apresentaram médias de M50 estatisticamente semelhantes, enquanto que para a repetição B2, há um grupo em que as médias são maiores que o outro (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios em que ocorreu a morte de 50% da saúvas (M50), para cada tratamento, para o ensaio de ingestão de dieta

tratamento	B1[1]	B2[1]
controle com dieta + água	8,00 a	10,67 c
controle sem dieta + água	4,67 b	4,33 e
controle sem dieta e sem água	4,83 b	4,50 de
0,01% de cafeína + água	4,17 b	6,83 d
0,05% de cafeína + água	4,83 b	4,00 e
0,10% de cafeína + água	4,67 b	5,00 de
0,50% de cafeína + água	5,00 b	4,17 e

[1]Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

Ao comparar os resultados das dietas com cafeína com as situações controle, para a repetição B1, observou-se dois grupos de médias: um maior (controle com dieta sem cafeína com oferecimento de água, letra “a”) e outro menor (com os demais tratamentos, letra “b”). Em relação à repetição B2, três grupos de médias foram observados: um em que a média foi a maior (letra “c” – controle com dieta sem cafeína com oferecimento de água), um intermediário (letra “d” – controle sem dieta e sem água, 0,01% de cafeína e 0,50 % cafeína) e um no qual a média foi menor (letra “e” – controle sem dieta com oferecimento de água, controle sem dieta e sem água, 0,05 % de cafeína, 0,10 % de cafeína e 0,50 %de cafeína). Vale ressaltar que um mesmo tratamento pode fazer parte de dois diferentes grupos quando o teste comparativo é realizado aos pares e há mais de dois tratamentos em estudo.

Com os resultados das análises estatísticas, foi observado que a tampa com água não é um fator que influi na sobrevivência das saúvas, pois as mortalidades no

controle sem água e sem dieta e no controle com água e sem dieta (controle sem dieta) são estatisticamente semelhantes nas duas repetições (Tabela 7). Na repetição B1 essa semelhança é bastante clara, já na B2 o valor de M50 obtido para o controle sem dieta e sem água ficou indefinido entre dois grupos, como já descrito no parágrafo anterior. A dieta permite uma sobrevivência maior quando comparada à ausência dela (controle com dieta x controle sem dieta). Dietas com cafeína possuem mortalidades semelhantes à ausência de dieta.

Apesar dessas observações obtidas ao analisa o resultado do teste comparativo de Tukey, é importante ressaltar que pelo fato do número de amostras ter sido baixo, é difícil realizar afirmações sobre pequenas diferenças obtidas. Dessa forma, apenas dois grupos na repetição B2 devem ser considerados: um seria o do grupo controle com dieta e água (letra “c”) e o outro, os demais tratamentos, desconsiderando assim as letras “d” e “e”. com essa observação, as duas repetições apresentam um mesmo resultado, com as saúvas sobrevivendo mais quando a dieta sem cafeína é fornecida e apresentam mortalidade semelhante quando são submetidas a dietas com cafeína ou à completa ausência de dieta.

O valor de M50 obtido no controle em que não foram fornecidas água nem dieta (4,67 dias para B1 e 4,33 dias para B2) foi de aproximadamente 3 dias, próximo ao encontrado por Bueno *et al.* (1997), sendo a dieta testada semelhante à utilizada pelos autores. A M50 para a situação controle em que foi fornecida apenas água também foi semelhante nos dois trabalhos. Entretanto, para o controle com dieta e água, os valores obtidos (8,00 dias e 10,67 dias) foram menores que o observado por Bueno *et al.* (1997), de aproximadamente 12 dias. Não é possível afirmar se as diferenças nesses dois trabalhos são significativas ou não, porém, podemos sugerir que as saúvas alimentam-se da dieta, o que leva a uma maior sobrevivência. Como o fornecimento da tampa contendo algodão umedecido com água não influenciou no aumento da sobrevivência, essa tampa poderia deixar de fazer parte do experimento, simplificando sua realização, pois não seria necessária a troca do algodão e limpeza da tampa.

A maior sobrevivência com a presença da dieta pode ser explicada pela glicose presente em sua formulação, uma vez que a glicose pode ser responsável por até 50% das necessidades nutricionais das operárias. Silva *et al.* (2003) constataram um aumento na sobrevivência das saúvas em condições experimentais num período de até 25 dias quando as dietas continham glicose em sua composição.

Essa mortalidade semelhante entre a ausência de dieta e as dietas contendo cafeína poderia ser explicada de duas maneiras: ou as saúvas rejeitam dietas contendo cafeína, mesmo na menor concentração, preferindo não se alimentar delas, ou as saúvas se alimentam das dietas e a cafeína seria responsável por acelerar a morte dos insetos, sendo essa mortalidade semelhante à observada em saúvas mantidas na ausência de dieta.

De acordo com observações do estado da dieta após a troca diária, é possível afirmar que as saúvas não ingeriram a dieta, pois não havia sinais de corte ou mordida na superfície das dietas que continham as diferentes concentrações de cafeína, sugerindo mesmo uma rejeição. Um motivo para explicar a possível rejeição das saúvas por dietas contendo cafeína seria o fato dessa substância apresentar um gosto amargo (Caffeine Material Safety Data Sheet, 2000). No caso da aplicação desse metabólito em iscas, como sugerido anteriormente, algum atrativo deveria ser adicionado à dieta (isca), como por exemplo, suco de citrus, na tentativa de mascarar a presença da cafeína na dieta (Lopez & Orduz, 2003).

Pelo modelo experimental utilizado nesse ensaio, não é possível afirmar se a cafeína possui uma atividade tóxica às saúvas ou apenas uma atividade repelente, ao contrário do observado no ensaio *in vitro* com o fungo mutualista, no qual na concentração mais alta (0,50%) o fungo do inóculo inicial morreu dias após entrar em contato com o meio de cultura contendo cafeína.

Os dados obtidos nas duas repetições desse ensaio também foram testados para verificar se as variações em cada tratamento são semelhantes entre si. Entretanto, ao contrário do ocorrido no ensaio de crescimento *in vitro* do fungo mutualista (ver item 4.3) no qual foi possível reunir os dados das duas repetições numa só tabela, nesse ensaio de ingestão não foi possível a realizar a união dos dados, pois o teste de Tukey não demonstrou semelhanças nas variações dos dados entre os tratamentos semelhantes. Isso pode ser explicado pelo fato das condições ambientais no ensaio com o fungo terem sido melhor controladas, pois as placas-de-petri foram mantidas em estufas com um rígido controle de temperatura e de luminosidade, enquanto que no ensaio com ingestão, não foi possível manter essa rigidez no controle da temperatura, da umidade e da luminosidade. Além disso, as variações obtidas na repetição B2 são muito próximas, as quais possivelmente não seriam observadas caso o tamanho da amostra fosse maior.

5. CONCLUSÕES

O meio de cultura MEA LP não apresentou taxa de crescimento radial estatisticamente diferente do obtido no meio Pagnocca B, sendo escolhido para realização do ensaio com a cafeína, pois possui uma formulação mais simplificada e é mais transparente, o que facilita a mensuração utilizando a metodologia descrita nesse trabalho.

Meio de cultura contendo cafeína influi no crescimento do fungo, dependendo da concentração desse metabólito. Foi possível observar três padrões de crescimento do fungo em função da concentração de cafeína no meio de cultura: ausência de efeito quando a concentração de cafeína é baixa (0,01%), sendo o crescimento do fungo semelhante à situação controle; diminuição do crescimento do fungo em concentração intermediária (0,05%); e baixo crescimento do fungo, ou praticamente ausência de crescimento, em condições de elevadas concentrações de cafeína (0,10% e 0,50%).

O oferecimento de dietas contendo cafeína, independente da concentração desse metabólito, acarretou níveis de mortalidades das saúvas semelhantes à ausência de dieta, devido, provavelmente, a ausência de ingestão dessas dietas.

Assim, pode-se sugerir que a observação de que as saúvas na natureza forrageiam folhas contendo concentrações baixas de cafeína (abaixo de 0,5%, relativo ao peso seco da folha) pode ser explicado pelo fato desses insetos não consumirem diretamente essa folhas. Ao contrário, elas fornecem esse material vegetal como substrato ao fungo mutualista (capaz de crescer normalmente em contato com concentrações baixas de cafeína), que é capaz de transformar esse substrato para seu próprio proveito e fornecer como alimento às saúvas na forma de gongilídeos.

5.1. Possível utilização da cafeína para o combate de formigas cortadeiras

Apesar de já ser utilizada em estudos para o combate a outros animais como lesmas e caracóis (Hollingsworth *et al.*, 2003), a cafeína surge como um potencial metabólito para o combate das formigas cortadeiras, pois é capaz de reduzir o crescimento do fungo ou até matá-lo.

Ao ser utilizada em iscas, é um método econômico e ecologicamente seguro,

possuindo baixa toxicidade a outros animais, como por exemplo para pássaros (Avery *et al.* 2005). A baixa toxicidade aos animais vertebrados é devido ao fato da cafeína ser solúvel em água (The Merck Index, 1996), permitindo uma rápida absorção para o sangue e, conseqüentemente, rápida eliminação pela urina, evitando assim a acumulação no organismo, o que causaria efeitos tóxicos devido à alta concentração. Isso pode ser comprovado pelo fato de após 12 horas de ingestão, aproximadamente 90% da cafeína é metabolizada ou excretada do organismo.

A cafeína é obtida em quantidades comerciais via síntese ou como um produto da descafeinação do café. Do ponto de vista da comercialização, a cafeína possui algumas vantagens sobre os demais produtos utilizados no combate a insetos: é uma substância conhecida e que não causaria receio ao usuário; é solúvel em água, sendo que 1 g de cafeína pode ser dissolvido em 46mL de água à temperatura ambiente (The Merck Index, 1996), o que permite realizar a limpeza de excessos no local de aplicação, pois esses poderiam ser lavados com água da chuva ou de irrigação; a cafeína é classificada como segura, sendo permitida sua utilização em bebidas até uma concentração de 0,02 % (Código de Regulamentos Federais, 2007). Entretanto, deve ser ressaltado que a cafeína, apesar de ser utilizada em bebidas, é relativamente tóxica na forma pura, possuindo uma M50 em ratos de 192 mg/kg (Caffeine Material Safety Data Sheet, 2000).

RESUMO

As formigas cortadeiras (Hymenoptera-Formicidae) estão distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. São herbívoros comuns de florestas que coletam material vegetal para cultivar um fungo mutualista específico. São conhecidas pelo seu papel ecológico na aeração do solo, na infiltração da água e na ciclagem de nutrientes. Atividades humanas, como o desmatamento e a agricultura, afetam o ambiente, alterando também o comportamento das saúvas, que acabam atacando os espécimes cultivados. Devido aos prejuízos causados à agricultura, novos inseticidas específicos são necessários. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos usando metabólitos secundários para essa finalidade. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da cafeína na mortalidade de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualístico *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Leucocoprineae: Agaricaceae), obtidos de sauveiros mantidos em laboratório. Foram utilizadas quatro concentrações de cafeína, 0,01%, 0,05%, 0,10% e 0,50%. Mortalidade das formigas foi avaliada pelo ensaio de ingestão, acrescentando a cafeína a dietas artificiais sólidas. A cafeína foi incorporada ao meio de cultura para medir a sua influência no crescimento *in vitro*. Independente das concentrações de cafeína, esse metabólito parece atuar como repelente para a saúvas. A respeito do fungo, quanto maior a concentração de cafeína, menor o crescimento *in vitro*. Inibição do crescimento foi observada em 0,10% e 0,50% e morte do fungo foi observada em algumas amostras Em conclusão, os resultados sugerem que a cafeína pode ser usada como fungicida, sendo adicionada a iscas que serão coletadas pelas formigas e carregada aos ninhos, causando a redução do fungo e/ou a morte e consequentemente, a morte das formigas.

ABSTRACT

The leaf-cutting ants (Hymenoptera-Formicidae) are found from south of United States to Argentina. They are common florest herbivorous which collect plant material to feed a specific mutualist fungus. These insects are known by their ecological role at soil aeration, water permeation and nutrient cycling. Human activities, like deforestation and agriculture, affect the environment, affecting the behavior of leaf-cutting ants, which start to attack the crops. Due to crops lost, new specific pesticides are needed. Several researches have been developed using secondary metabolites for this purpose. The present work aimed to evaluate the effect of caffeine at *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) mortality, and at *in vitro* growth of the mutualist fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Leucocoprineae: Agaricaceae), collected from laboratory nests. Four caffeine concentrations were tested: 0.01%, 0.05%, 0.10% and 0.50%. Ant's mortality was evaluated by ingestion assay, adding caffeine to artificial diets. Caffeine was added to culture medium, to measure its influence on *in* vitro fungus growth. Despite caffeine concentrations, this compound seems to act as repellent to ants. Concerning to the fungus, the higher the caffeine concentration, the lower the *in vitro* fungus growth. Growth inhibition was observed at both 0.10% and 0.50% concentrations and death of fungus was observed in some samples. In conclusion, the results suggest that caffeine could be used as fungicide, being added to baits which could be collected by ants and carried to the nests, causing fungus reduction and/or death and consequently, the death of the nests.

Referências Bibliográficas

About pesticides. [sítio da Internet] Estados Unidos: Environmental Protection Agency [atualizado em 24 de Julho de 2007; citado em 13 de Agosto de 2007]. Disponível em: www.epa.gov/pesticides/about/index.htm

Abril, A. B. & Bucher, E. H. (2004) Nutritional sources of the fungus cultured by leaf-cutting ants. *Applied Soil Ecology* 26:243-247.

Affonso, P. (2002) Comportamento forrageiro de *Atta sexdens* L. em relação a folhas de *Coffea* L. e alguns de seus constituintes químicos. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. (1997) Biologia molecular da célula. 3ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas.

Autuori, M. (1940) Algumas observações sobre formigas cultivadoras de fungo (Hym. Formicidae). *Revista de Entomologia*, 11:215-226.

Avery, M. L.; Werner, S. J.; Cummings, J. L.; Humphrey, J. S.; Milleson, M. P.; Carlson, J. C.; Primus, T. M. & Goodall, M. J. (2005) Caffeine for reducing bird damage to newly seeded rice. *Crop Protection*, 24: 651-657.

Bass, M. & Cherrett, J. M. (1995) Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiological Entomology*, 20:1-6

Beattie, A. J., Turnbull, C. L., Hough, T. & Knox, R. B. (1986) Antibiotic production: a possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79(3):448-450.

Bennettm J. & Weeds, A. (1986) Calcium and the cytoskeleton. *British Medical Bulletin,* 42: 385-390.

Bigi, M. F. M. A.; Torkomian, V. L. V.; Groote, S. T. C. S.; Hebling, M. J. A.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C. e Silva, M. F. G. F. (2004). Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Management Science*, 60: 933-938.

Blaustein, M. P. (1988). Calcium transport and buffering in neurons. *Trends in Neurosciences*, 11(10): 438-443.

Bononi, V. L. R.; Autuori, M. & Rocha, M. B. (1981) *Leucocoprinus gongylophorus* (Möller) Heim, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Rickia* 9:93-97.

Bot, A. N. M., Currie, C. R., Hart, A. G. & Boomsma, J. J. (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethology Ecology and Evolution*, 13:225-237.

Bot, A. N. M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R. & Boomsma, J. J. (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux.* 49:363-370.

Bueno, O. C.; Morini, M. S. C.; Pagnocca, F. C.; Hebling, M. J. A. & Silva, O. A. (1997) Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26(1):107-113.

Butcher, R. W. & Sutherland, E. W. (1962) Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *Journal of Biological Chemistry*, 237(4): 1244-1250.

Cafaro, M. J. & Currie, C. R. (2005) Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Canadian Journal of Microbiology* 51(6): 441-446.

Caffeine Material Safety Data Sheet. [sítio da Internet]. Estados Unidos: Department of Chemistry, Iowa State University [revisado em 08 de Fevereirol de 2000; citado em 15 de Agosto de 2007]. Disponível em http://avogadro.chem.iastate.edu/MSDS/caffeine.htm

Camargo, M.C.R. & Toledo, M.C.F. (1998) Teor de cafeína em cafés brasileiros. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(4): 421-424

Carlile, M. J. & Watkinson, S. (1995) *The Fungi*. 2nd Ed. Academic Press, Inc. Sand Diego, CA. 588p.

Cazin Jr., J.; Wiemer, D. F. & Howard, J. J. (1989) Isolation, growth characteristics, and long-term storage of fungi cultivated by Attini ants. *Applied and Environmental Microbiology* 55(6):1346-1350.

Chapela, I. H.; Rehner, S. A.; Schultz, T. R. & Mueller, U. G. (1994) Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, 266(5191):1691-1694.

Cherrett, J. M. (1968) The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology,* 37:387-403.

Clémençon, H. (2004) Hymenomycetes, Termites and Ants. In: *Cytology and Plectology of the Hymenomycetes*. Editora J. Cramer. Berlin, Stuttgart.

Código de Regulamentos Federais. [sítio da Internet]. Estados Unidos: Food and Drug Administrtion (FDA) [revisado em 01 de Abril de 2003; citado em 13 de Agosto de 2007]. Disponível em http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/aprqtr/21cfr182.1180.htm

Craven, S. E., Dix, M. W. & Michaels, G. E. (1970) Attine fungus gardens contain yeasts. *Science*, 169:184-186.

Croghan, P. C. & Noble-Nesbitt, J. (1989) A note on the diffusion of water across oil and wax layers and insect cuticles. *J. Exp. Biol.,* 143: 537-541.

Currie, C. R., **Scott, J. A., Summerbell, R. C. & Malloch, D.** (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398: 701-704.

Currie, C. R. & Stuart, A. E. (2001) Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society of London* 268:1033-1039.

Currie, C. R. 2002. *Ants, Agriculture, And Antibiotics*. In: Seckbach, J. 2002. *Symbiosis: mechanisms and model system*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston.

Currie, C. R.; Poulsen, M.; Mendenhall, J.; Boomsma, J. J. & Billen, J. (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311:81-83.

Daly, J. W. (2000) Alkylxanthines as research tools. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81: 44-52.

Dash, S. S. & Gummadi, S. N. (2006) Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters*, 28:1993-2002.

Davis, J. M.; Zhao, Z.; Stock, H. S.; Mehl, K. A.; Buggy, J. & Hand, G. A. (2003) Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 284(2): R399-R404.

Diehl-Fleig, E., Silva, M. E. & Pacheco, M. R. M. (1988) Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. *Ciência e Cultura*, 40(11):1103-1105.

Erowid Caffeine Vault: Content in Beverages. [sítio da Internet]. Estados Unidos: Erowid [revisado em 16 de Julho de 2007; citado em 16 de Agosto de 2007]. Disponível em http://www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine_info1.shtml

Fact Sheet: Caffeine and Health. [sítio da Internet]. Estados Unidos: Internationa Food Information Council [revisado em Agosto de 2007; citado em 16 de Agosto de 2007]. Disponível em http://www.ific.org/publications/factsheets/caffeinefs.cfm

Fernandes, J. B.; David, V.; Facchini, P. H.; Silva, M. F. G. F., Rodrigues Filho, E.; Vieira, P. C.; Galhiane, M. S.; Pagnocca, F. C.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J.; Victor, S. R. & Santos, A. M. R. (2002) Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Química Nova*, 25(6B):1091-1095.

Fernández, F. (2003) *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt.

Ferré, S.; Snaprud, P., & Fuxe, K. (1993) Opposing actions of an adenosine A_2 receptor agonist and a GTP analogue on the regulation of dopamine D_2 receptors in rat neostriatal membranes. *European Journal of Pharmacology*, 244: 311-315.

Fisher, P. J.; Stradling, D. J. & Pegler, D. N. (1994) *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycological Research*, 98(8):884-888.

Fisone G.; Borgkvist, A. & Usiello, A. (2004). "Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action". *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 857-872.

Freeland, W. J. (1976) Pathogens and the evolution of primate sociality. *Biotropica*, 8(1): 12-24.

Godoy, M. F. P.; Victor, S. R.; Bellini, A. M.; Guerreiro, G.; Rocha, W. C.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J. A.; Bacci Jr., M.; Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B. & Pagnocca, F. C. (2005). Inhibition of the Symbiotic Fungus of Leaf-Cutting Ants by Coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3B):669-672.

Ghosh, A. & Greenberg, M. E. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 268(5208): 239-247.

Goulet, H. & Huber, J. T. (1993) *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Centre for Landand Biological Resources Research. Ottawa, Ontario.

Haines, B. L. (1978) Element and energy flows through colonies of the leaf-cutting ant, *Atta colombica*, in Panama. *Biotropica*, 10(4):270-277.

Hewavitharanage, P.; Karunaratne, S. & Kumar, N. S. (1999) Effect of caffeine on shot-hole borer beetle (*Xyleborus fornicatus)* of tea (*Camellia sinensis*). *Phytochemistry*, 51: 35-41.

Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990) *The ants*. The Belknap Press. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Hölldobler, B & Wilson, E. O. (1995) *Journey to the ants: a story of scientific exploration*. The Belknap Press. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. London, Engrland.

Hollingsworth, R. G.; Armstrong, J. W. & Campbell, E. (2003) Caffeine as a novel toxicant for slugs and snails. *Annals of Applied Biology*, 142:91-97.

Howard, J. J., Cazin Jr., J. & Wiemer, D. F. (1988) Toxicity of terpenoid deterrents to the leafcutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. *Journal of Chemical Ecology,* 14(1):59-69.

Hughes, W. O. H.; Eilenberg; J. & Boomsma, J. J. (2002) Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceeding of the Royal Society of London*, 269:1811-1819.

Kennedy, M. B. (1989) Regulation of neuronal function by calcium. *Trends in Neurosciences*, 12(11): 417-420.

Kerr, W. E. (1961) Acasalamento de rainhas com vários machos em duas espécies da tribu Attini (Hymenoptera, Formicoidea). *Revista Brasileira de Biologia*, 21(1): 45-48.

Kreisel, H. (1972) Fungi from fungus gardens of *Atta insularis* in Cuba. *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie*, 12(8): 643-654.

Laranja, A. T.; Manzato, A. J. & Bicudo, H. E. M. C. (2003) Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Dipter, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4): 419-429.

Laranja, A. T.; Manzato, A. J. & Bicudo, H. E. M. C. (2006) Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, 40(6): 1112-1117.

Lewis, T., Pollard, G. V. & Dibley, G. C. (1974) Micro-environmental factors affecting diel patterns of foraging in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae: Attini). *Journal of Animal Ecology*, 43:143-153.

Lopez, E. & Orduz, S. (2003) *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes. Biological Control* 27:194-200.

Mariconi, F. A. M. (1970) *As saúvas*. Editora Agronômica "Ceres". Piracicaba, São Paulo.

Martin, M. M. & Martin, J. S. (1970) The biochemical basis for the symbiosis between the ant *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. *Journal of Insect Physiology* 16:109-119.

Mazzafera, P. (1991) Análises químicas em folhas de cafeeiros atacados por *Atta* spp. *Revista de Agricultura*, 66(1): 33-45.

Mazzafera, P. & Magalhães, A. C. N. (1991) Cafeína em folhas de espécies de *Coffea* e *Paracoffea*. *Revista Brasileira de Botânica*, 14: 157-160.

Mazzafera, P; Yamaoka-Yano, D. M. & Vitória, A. P. (1996) Para que serve a cafeína em plantas? *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 8(1): 67-74.

Mazzafera, P. (1999) Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. *Bragantia* 58(2):387-391.

McCall, A. L.; Millington, W. R. & Wurtman, R. J. (1982) Blood-brain barrier transport of caffeine: dose-related restriction of adenine transport. *Life Sciences*, 31: 2709-2715.

McPherson, P. S.; Kim, Y. K.; Valdivia, H.; Knudson, C. M.; Takekura, H.; Franzini-Armstrong, C.; Coronado, R. & Campbell, K. P. (1991) The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron*, 7: 17-25.

Medline Plus: Caffeine. [sítio na Internet]. Estados Unidos: US National Library of Medicine amd National Institutes of Health [atualizado em 07 de Agosto de 2007; citado em 15 de Agosto de 2007]. Disponível em http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/caffeine.html

Miller, R. J. (1988). Calcium signalling in neurons. *Trends in Neurosciences*, 11(10): 415-419.

Moncalvo, J. M.; Vilgalys, R.; Redhead, S. A.; Johnson, J. E.; James, T. Y.; Aime, M. C.; *et al.* (2002) One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23:357-400.

Monteiro, M. R.; Torkomian, V. L. V.; Pagnocca, F. C.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Bueno, O. C. & Hebling, M. J. A. (1998) Activity of extracts and fatty acids of *Canavalia ensiformis* (Leguminosae) against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ants *Atta sexdens. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 70(4):733-736.

Mueller, U. G.; Gerardo, N. M.; Aanen, D. K.; Six, D. L. & Schultz, T. R. (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36: 563-595.

Mullenax, C. H. (1979) The use of jackbean (*Canavalia ensiformis*) as a biological control for leaf-cutting ants (*Atta* spp.). *Biotropica*, 11(4): 313-314.

Nair, M. S. R. & Hervey, A. (1979) Structure of lepiochlorin, an antibiotic metabolite of a fungus cultivated by ants. *Phytochemistry*, 18: 326-327.

Nascimento, R. R., Schoeters, E., Morgan, E. D., Billen, J. & Stradling, D. J. (1996) Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa, Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera:Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 22(5):987-1000.

Nathanson, J. A. (1984) Caffeine and related methylxanthines – possible naturally-ocurring pesticides. *Science*, 226 (4671): 184-187.

North, R. D.; Jackson, C. W. & Howse, P. E. (1997) Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Tree*, 12(10): 386-389.

Odling-Smee, F. J.; Laland, K. N. & Feldman, M. W. (2003) *Niche construction: the neglected process in evolution*. Monographs in population biology – 37. Princeton University Press.

Oster, G. F. & Wilson, E. O. (1978) *Caste and ecology in the social insects.* Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Pagnocca, F. C.; Silva, O. A.; Hebling-Beraldo, M. J.; Bueno, O. C.; Fernandes, J. B. & Vieira, P. C. (1990) Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bulletin of Entomological Research*, 80:349-352.

Pagnocca, F. C.; Ribeiro, S. B.; Torkomian, V. L. V.; Hebling, M. J. A.; Bueno, O. C.; Silva, O. A.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F. & Ferreira, A. G. (1996) Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Journal of Chemical Ecology* 22(7):1325-1330.

Poulsen, M.; Bot, A. N. M.; Nielsen, M. G. & Boomsma, J. J. (2002) Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52(2): 151-157.

Quinlan, R. J. & Cherrett, J. M. (1979) The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, 4:151-160.

Ribeiro, S. B.; Pagnocca, F. C.; Victor, S. R.; Bueno, O. C.; Hebling, M. J.; Bacci Jr, M.; Silva, O. A.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C. & Silva, M. F. G. F. (1998)

Activity of Sesame Leaf Extracts Against the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens* L. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27(3):421-426.

Richard, F. J.; Mora, P.; Errard, C. & Rouland, C. (2005) Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 175:297-303.

Rizvi, S. J. H.; Jaiswal, V.; Mukerji, D. & Mathur, S. N. (1980) Antifungal properties of 1,3,7-trimethylxanthine, isolated form *Coffea arabica*. *Naturwissenschaften*, 67: 459-460.

Rockwood, L. L. (1975) The effects of seasonality on foraging in two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in Guanacaste Province, Costa Rica. *Biotropica*, 7(3):176-193.

Rockwood, L. L. (1976) Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecology,* 57:48-61.

Rockwood, L. L. (1977) Foraging patterns and plant selection in Costa Rica leaf cutting ants. *Journal of the New York Entomological Society,* 85(4):222-233.

Rockwood, L. L. & Hubbell, S. P. (1987) Host-plant selection, diet diversity, and optimal foraging in a tropical leafcutting ant. *Oecologia*, 74:55-61.

Rosengaus, R. B.; Maxmen, A. B.; Coates, L. E. & Traniello, J. F. A. (1998) Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termosidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 44(2): 125-134.

Ruppert, E. E. & Barnes, R. D. (1996) *Zoologia dos invertebrados*. Sexta edição. Ed. Rocca Ltda. São Paulo.

Santos, A. V.; Dillon, R. J.; Dillon, V. M.; Reynolds, S. E. & Samuels, R. I. (2004) Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters,* 239:319-323.

Santos, A. V.; Oliveira, B. L. & Samuels, R. I. (2007) Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologi,a* 163:233-240.

Shi, D.; Padgett, W. L. & Daly, J. W. (2003) Caffeine analogs: effects on ryanodine-sensitive calcium-release channels and $GABA_A$ receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(3): 331-347.

Silva, M. E. & Diehl-Fleig, E. (1988) Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 17:263-269.

Silva, A. S.; Bacci Jr., M.; Siqueira, C. G.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C. & Hebling, M. J. A. (2003) Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology,* 49:307-313.

Silva-Pinhati, A. C. O.; Bacci Jr., M.; Hinkle, G.; Pagnocca, F. C.; Martins, V. G.; Bueno, O. C. & Hebling, M. J. A. (2004) 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*, 37:1463-1472.

Silva-Pinhati, A. C. O.; Bacci Jr, M.; Siqueira, C. G.; Silva, A.; Pagnocca, F. C.; Bueno, O. C. & Hebling M. J. A. 2005. Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology* 34(1):1-5.

Sutherland, E. W. & Rall, T. W. (1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry*, 232(2): 1077-1091.

Suzuki, T.; Ashiara, H. & Waller, R. (1992) Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. *Phytochemistry*, 31(8): 2575-2584.

The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12nd Ed. Merck & CO., Inc. Whitehouse Station, NJ. (1996)

Traniello, J. F. A.; Rosengaus, R. B. & Savoie, K. (2002) The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10): 6838-6842.

Tree of Life Web Project. Attini, Fungus-growing ants [sítio na Internet]. University of Arizona College of Agriculture and Life Sciences e University of Arizona Library [atualizado em 22 de Março de 2004; citado em 02 de Agosto de 2007]. Disponível em http://tolweb.org/tree?group=Attini

Verchot, L. V.; Moutinho, P. R. & Davidson, E. A. (2003) Leaf-cutting ant (*Atta sexdens)* and nutrient cycling: deep soil inorganic nitrogen stocks, mineralization, and nitrification in Eastern Amazonia. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1219-1222.

Weber, N. A. (1956) Fungus-growing ants and their fungi: *Trachymyrmex septentrionalis. Ecology* 37(1): 150-161.

Weber, N. A. (1966) Fungus-growing ants. *Science*, 153:587-604.

Wetterer, J. K.; Schultz, T. R. & Meier, R. (1998) Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9(1): 42-47.

Wheeler, W. M. (1965) Ants. Their structure, development and behavior. Columbia University Press. New York and London.

Wilson, E. O. (1990) *Success and Dominance in Ecosystems: The Case of the Social Insects*, Ecology Institute, Oldendorf/Luhe.