

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANDRÉIA VILANI

ATIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITARIOS NATURAIS SOBRE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki* E SELETIVIDADE A *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

ATIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITARIOS NATURAIS SOBRE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki* E SELETIVIDADE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa
Co-Orientadores: Prof. Dr. Everton Ricardi
Lozano da Silva
Prof^a. Dra. Michele Potrich

PATO BRANCO

2013

Catlogação na Fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

V696a Vilani, Andréia

Atividade de produtos de produtos fitossanitários naturais sobre *Anticarsia gemmalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e seletividade a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) / Andréia Vilani. - 2013.

85 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Alfredo de Gouvêa

Coorientador: Michele Potrich

Coorientador: Everton Ricardi Lozano da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco / PR, 2013.

Bibliografia: f. 73 - 85

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. Controle associado. 3. Compatibilidade. I. Gouvêa, Alfredo de, orient. II. Potrich, Michele coorient. III Silva, Everton Ricardi Lozano da Silva, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22.ed.)630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n.º 071

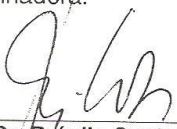
Atividade de produtos fitossanitários naturais sobre *Anticarsia gemmatilis* Hüber (Lepidoptera: Noctuidae), *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *Kurstaki* e seletividade a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

por

Andréia Vilani

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e treze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho. *aprovado*.....


Banca examinadora:



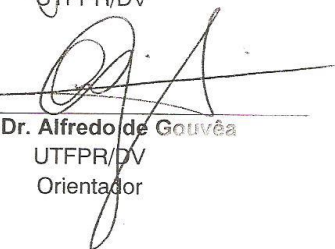
Prof. Dr. Bráulio Santos
UTFPR/Curitiba



Prof. Dr. Everton Lozano Ricardi da
Silva
UTFPR/DV



Prof. Dr. Michele Potrich
UTFPR/DV



Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa
UTFPR/DV
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. André Brugnara Soares
Coordenador do PPGAG

Dedico este trabalho a Tiago Cambuzzi, aos meus pais Alice Fontana Vilani e Olivio Vilani ao meu irmão André Luis Vilani, pessoas que mais amo nessa vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a força necessária para completar essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Alfredo de Gouvêa, por ter me acolhido como orientada, por toda sua dedicação, e ensinamentos transmitidos.

A Prof^a. Dra Michele Potrich e ao Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva pela dedicação como co-orientadores, amizade, paciência e por toda a ajuda desde o início do desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Américo Wagner pelo fornecimento de materiais para o desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus pais Alice e Olivio e ao meu irmão André, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Em especial ao meu companheiro Tiago, por todo o seu amor, pelo incentivo e compreensão principalmente nos momentos de ausência.

Aos meus queridos Rubia Julieti Cambuzzi Smaniotto, Adelir Smaniotto e Arthur Leonardo Smaniotto, pela ajuda e pela força nos momentos difíceis.

A colega de mestrado e de laboratório Daiane Luckamm, pela amizade, companheirismo e ajuda.

Aos amigos Claucia Guzzi, Etiane Tanise Sonogo, Letícia Bertusso Toffoli e Zenilson Balem pela companhia, pelas tantas experiências compartilhadas em tempos de estudo, experimentos, nos momentos bons, nos não tão bons assim e nesses por todos os consolos.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Biológico, Carla, Aline, Bárbara, Thiego, Dieli, Thiago, Sidiney, Lisia, Fernando, Matheus, Lucas, Grasi, pela amizade, pelos intermináveis momentos de risos, e pela ajuda fundamental no desenvolvimento dos experimentos.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de estudo.

Aos colegas do Apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa de Apicultura (UNEPE Apicultura) da UTFPR-DV, em especial a Prof.^a Dra. Fabiana Martins Costa Maia pela ajuda.

Aos professores do PPGAG, pelo conhecimento transmitido.

“Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos
começos.” Lao Tsé.

RESUMO

VILANI, Andréia. Atividade de Produtos Fitossanitários Naturais sobre *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e seletividade a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

Conhecer os efeitos dos produtos fitossanitários naturais (PFN) sobre insetos praga e organismos não alvo é fundamental no contexto do Manejo Integrado de Pragas. Esse trabalho objetivou avaliar a atividade de PFN sobre *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk) e a seletividade sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Foram utilizados os extratos de pitanga (*Eugenia uniflora*), pimenta (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*), trombeta (*Brugmansia suaveolens*) e uva-do-japão (*Hovenia dulcis*), à 5%, Natuneem[®], Natualho[®], Pironat[®], Rotenat[®] e Calda Bordalesa (CB), na concentração recomendada pelo fabricante. Para esporos, os tratamentos Btk + PFN e Btk, isoladamente, foram incubados em agitador horizontal (150 rpm, 30 ± 2 °C, 2 h) e, inoculados em meio de cultura ágar nutriente (AN), em placas de Petri. Foram preparadas quatro placas (repetições), acondicionadas em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h), quantificando-se as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Para cristais, os PFN e Btk, isoladamente, água destilada esterilizada (testemunha) e Btk + PFN, após incubação, nas condições descritas acima, foram aplicados sobre cubos de dieta artificial para *A. gemmatalis*, em placas de Petri, que receberam 20 lagartas de segundo ínstar, cada. Foram preparadas quatro placas (repetições), acondicionadas em câmara climatizada (26 ± 2 °C, UR: 70%±10 % fotofase 14 h). Avaliou-se a mortalidade após, 24, 48, 72, 96 e 120 h, o percentual de empupamento e emergência e o período ovo-adulto. A seletividade sobre *A. mellifera* foi avaliada pulverizando-se os tratamentos sobre operárias e adicionando-os a pasta Cândi. Como testemunha utilizou-se respectivamente água destilada esterilizada e pasta Cândi pura. Em ambos os experimentos utilizou-se 30 operárias por tratamento (repetição), individualizadas em tubos de vidro (10 cm × 2,5 cm), acondicionados em câmara climatizada (25 ± 2 °C, U.R. 70% ± 10%, fotofase de 12 h) e a mortalidade, avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 h. Verificou-se que os extratos de pitanga, pimenta e uva-do-japão reduziram significativamente as UFC/mL. O extrato de pitanga foi o único que afetou negativamente a toxicidade dos cristais de Btk. Nenhum extrato vegetal afetou a mortalidade, não havendo diferença entre os tempos de avaliação, nem o empupamento, emergência e período ovo-adulto. Na mistura com Btk o extrato de pitanga retardou a mortalidade e o extrato de pimenta acelerou a mortalidade. Nos experimentos com *A. mellifera*, houve redução significativa, apenas para o extrato de uva-do-japão, quando pulverizado. Os produtos Natuneem[®] e Rotenat[®] aumentaram significativamente as UFC/mL. Somente a CB afetou negativamente a toxicidade dos cristais de Btk. Nos demais parâmetros, observou-se redução significativa do percentual de empupamento para CB e Natualho[®] e percentual de emergência para CB e Natuneem[®]. Entre os tempos de avaliação, não houve influência dos produtos isolados, na mistura com Btk Natualho[®], Pironat[®], Rotenat[®] aceleraram a mortalidade e a CB influenciou negativamente. Não se verificou atividade dos produtos sobre o período ovo-adulto. Para *A. mellifera*, em ambos os experimentos, os produtos não afetaram significativamente a longevidade.

Palavras-chave: Bactérias entomopatogênicas. Controle associado. Compatibilidade.

ABSTRACT

VILANI, Andréia. Activity of Natural Products Phytosanitary on *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and selectivity to *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae). 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

Knowing the effects of natural products phytosanitary (NPP) on pests and organisms target is not essential in the context of Integrated Pest Management. This study aimed to evaluate the activity of PFN on *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) and selectivity of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). We used extracts of cherry (*Eugenia uniflora*), pepper (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*), trumpet (*Brugmansia suaveolens*) and Blueberry japan (*Hovenia dulcis*), to 5%, Natuneem[®], Natualho[®], Pironat[®], Rotenat[®] Bordeaux and Syrup (SB), the concentration recommended by the manufacturer. For spores, the treatments Btk + NFP and Btk alone were incubated on horizontal shaker (150 rpm, 30 ± 2 ° C, 2 h) and inoculated onto nutrient agar plates (NA), in petri dishes. We prepared four plates (repetitions), placed in a climatic chamber (30 ± 2 ° C, 18 h), quantifying the colony forming units (CFU) / mL. To crystals, the PFN and Btk alone sterilized distilled water (control) and Btk + NFP after incubation under the conditions described above were applied on artificial diet cubes for *A. gemmatalis*, in Petri dishes, which received 20 second instar larvae of each. We prepared four plates (repetitions), placed in a climatic chamber (26 ± 2 ° C, RH 70% ± 10% photophase 14 h), evaluating mortality after 24, 48, 72, 96 and 120 h, the percentage empupament and the emergence and egg-adult period. The selectivity of *A. mellifera* was evaluated by spraying treatments on workers and adding them to pasta Candi. As a control we used respectively sterile distilled water and paste Candi pure. In both experiments, we used 30 workers per treatment (repeat), individually in glass tubes (10 cm × 2.5 cm), packed in a climatic chamber (25 ± 2 ° C, RH 70% ± 10%, photophase 12 h) mortality, assessed by one, two, three, four, five, six, nine, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72 and 96 h. It was found that the extracts of cherry, pepper and Blueberry japan significantly reduced CFU / mL. The cherry extract was the only negatively affecting toxicity of Btk crystals. No plant extract affected the mortality, there was no difference between the time of evaluation, nor empupament, emergence and egg-adult period. In mixture with Btk cherry extract delayed the mortality and pepper extract accelerated mortality. In experiments with *A. mellifera*, was significantly reduced only to extract Blueberry japan, when sprayed. Natuneem[®] products and Rotenat[®] were the only ones who have significantly increased CFU / mL. Only the SB negatively affected the toxicity of Btk crystals. Ns other parameters, there was significant reduction in the percentage of empupament for SB and Natualho[®] and percentage of emergency and SB Natuneem[®]. Between the time of evaluation, no influence of individual products, the mix with Btk Natualho[®], Pironat[®], Rotenat[®] accelerated mortality and SB negatively influenced. There was no activity of the products on the egg-adult period. To *A. mellifera*, in both experiments, the products did not significantly affect longevity.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Associated control. Compatibility.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Nome científico, família, nome comum e partes das plantas utilizadas para obtenção dos extratos vegetais avaliados nos bioensaios. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2 - Número médio (\pm EP) de UFC/mL de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e extratos vegetais a 5%, inoculados em meio de cultura ágar nutriente em placas de Petri e incubação em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h) e, pH inicial e final. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 29
- Tabela 3 - Porcentagem média (\pm EP) da mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *Anticarsia gemmatalis* causada por extratos vegetais a 5%, isoladamente e, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h e mortalidade acumulada, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) e pH inicial e final. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 33
- Tabela 4 - Porcentagem média (\pm EP) de empupamento e emergência real e relativa e período ovo-adulto de *Anticarsia gemmatalis* tratada com extratos vegetais aquosos à 5% isoladamente e, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 38
- Tabela 5 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após pulverização de extratos vegetais à 5%. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 42
- Tabela 6 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após fornecimento de pasta Cândi acrescida de extratos vegetais à 5% . Temperatura 26 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 43
- Tabela 7 - Nome comercial, composição, recomendação de uso e concentração recomendada dos produtos fitossanitários naturais utilizados nos experimentos. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 51
- Tabela 8 - Número médio (\pm EP) de UFC/mL de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada, inoculação em meio de cultura ágar nutriente, em placas de Petri e incubação em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h) e, pH inicial e final. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 55
- Tabela 9 - Porcentagem média (\pm EP) da mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *Anticarsia gemmatalis* causada por produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada isoladamente e, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h e mortalidade acumulada, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) e pH inicial e final. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 60
- Tabela 10 - Porcentagem média (\pm EP) de empupamento e emergência real e relativa e período ovo-adulto de *Anticarsia gemmatalis* tratada com produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 63
- Tabela 11 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após pulverização de produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, 2012. 69
- Tabela 12 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após fornecimento de pasta Cândi misturada aos produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012. 70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 CAPÍTULO I - ATIVIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS SOBRE <i>Anticarsia gemmatalis</i> HÜBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), <i>Bacillus thuringiensis</i> SUBESP. <i>kurstaki</i>, E SELETIVIDADE A <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE)	19
2.1 RESUMO.....	19
2.2 ABSTRACT.....	20
2.3 INTRODUÇÃO	21
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.4.2. Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre a Viabilidade de Esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	25
2.4.3 Determinação da concentração de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> para utilização nos bioensaios.....	26
2.4.4 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre <i>A. gemmatalis</i> e Sobre Cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki in vivo</i>	26
2.4.5 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre Operárias Adultas de <i>A. mellifera</i> ..	28
2.4.5.1 Pulverização dos extratos vegetais.....	28
2.4.5.2 Adição dos extratos vegetais em pasta Cãndi	28
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
2.5.1 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos sobre a Viabilidade de Esporos de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	29
2.5.2 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre <i>A. gemmatalis</i> e sobre Cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki in vivo</i>	32
2.5.3 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre Operárias Adultas de <i>A. mellifera</i> ..	41
2.5.3.1 Pulverização dos extratos vegetais.....	41
2.5.3.2 Adição dos extratos vegetais em pasta Cãndi	43
2.6 CONCLUSÕES	45
3 CAPÍTULO II - ATIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS NATURAIS COMERCIAIS SOBRE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hubner (Lepidoptera: noctuidae), <i>Bacillus thuringiensis</i> SUBESP. <i>kurstaki</i> E SELETIVIDADE A <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE)	46
3.1 RESUMO.....	46
3.2 ABSTRACT.....	47
3.3 INTRODUÇÃO	48

3.4 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.4.1 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre a Viabilidade de Esporos de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	51
3.4.2 Determinação da concentração de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> para utilização nos bioensaios.....	52
3.4.4 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre Operárias Adultas de <i>A. mellifera</i>	54
3.4.4.1 Pulverização dos produtos fitossanitários naturais comerciais	54
3.4.4.2 Adição dos produtos fitossanitários naturais comerciais em pasta Cândi	54
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.5.1 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais sobre a Viabilidade de Esporos de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	55
3.5.2 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre <i>A. gemmatalis</i> e Sobre Cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> <i>in vivo</i>	58
3.5.3 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais sobre Operárias Adultas de <i>A. mellifera</i>	68
3.5.3.1 Pulverização dos produtos fitossanitários naturais comerciais	68
3.5.3.2 Produtos fitossanitários naturais comerciais adicionados a pasta Cândi	70
3.6 CONCLUSÕES	72
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura convencional faz uso de produtos fitossanitários sintéticos como principal método de controle de insetos praga e patógenos. Contudo, essa prática, quando utilizada indiscriminadamente, causa problemas ambientais, pois muitos produtos utilizados são tóxicos ao homem e aos animais, contribuem para a seleção de populações de insetos praga resistentes e para a eliminação de inimigos naturais de pragas agrícolas, além de contaminarem os alimentos, o solo, a água e o ar (ALVES; MOINO JR.; ALMEIDA, 1998; CAVALCANTI et al., 2002; GLEISSMAN, 2005).

Um aspecto particular do efeito dos produtos fitossanitários sintéticos sobre o meio ambiente é o impacto sobre os polinizadores, tanto na sua diversidade quanto na sua abundância e eficiência de polinização (DRUCKER, 2004; PINHEIRO; FREITA, 2010).

Diante do exposto, torna-se necessário o estabelecimento de alternativas para o controle de pragas que sejam menos impactantes econômica e ecologicamente. Nesse contexto, os sistemas alternativos de produção, como os sistemas orgânicos, vêm ganhando cada vez mais espaço no cenário agrícola, tanto entre produtores quanto entre os consumidores.

O estado do Paraná é o segundo maior produtor de orgânicos do Brasil com cerca de 5,3 mil produtores e produção anual em torno de 107 mil toneladas, com média de crescimento de 20% ao ano (SEIM, 2009). As principais culturas produzidas são cana-de-açúcar, mandioca, frutas, hortaliças e soja, sendo a produção desta última, concentrada, principalmente, na região oeste e sudoeste do estado (DAROLT, 2002; SEIM, 2009).

A cultura da soja *Glycine Max* (L) Merrill (Fabaceae) está sujeita ao ataque de diversos insetos, sendo a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) uma das principais pragas, alimentando-se das folhas da planta, destruindo tanto o limbo como as nervuras e pecíolos, podendo causar desfolha de até 100% (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000).

Entre as alternativas adotadas nos sistemas alternativos para o controle de pragas destacam-se os produtos fitossanitários naturais como extratos vegetais, óleos essenciais, caldas fertiprotetoras, compostos para estabelecimento de equilíbrio nutricional das plantas, além do uso de agentes de controle biológico (PENTEADO, 2007). A obtenção de produtos fitossanitários naturais está voltada às substâncias que são produzidas naturalmente pelas

plantas, conhecidas como metabólitos secundários, as quais se constituem na principal forma de defesa da planta contra inimigos e competidores (MAIRESSE, 2005).

De modo geral, os produtos fitossanitários naturais podem causar diversos efeitos diretos e indiretos sobre os insetos, como inibição da oviposição (TORRES et al., 2006; DEQUECH et al., 2009; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010); inibição da alimentação (SAITO et al., 2004; KNAAK et al., 2012); alterações do sistema hormonal, alterações no comportamento sexual, esterilização dos adultos (GALLO et al., 2002; MARONEZE; GALLEGOS, 2009); inibição do crescimento (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006; TORRES et al., 2006); prolongamento de fases do ciclo biológico (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001; TORRES et al., 2006; CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010; KNAAK et al., 2012); inviabilidade de ovos (TORRES et al., 2006; CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006); alterações morfológicas (KNAAK et al., 2012); redução na fertilidade (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006; KNAAK et al., 2012); mortalidade na fase imatura ou adulta (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001; GALLO et al., 2002; CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006; TORRES et al., 2006; DEQUECH et al., 2009; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010; KNAAK et al., 2012); entre outros.

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos, sobretudo nas últimas décadas, com produtos fitossanitários naturais sobre insetos praga e vetores de doenças. O extrato de alho, *Allium sativum* L. (Liliaceae) avaliado sobre larvas de *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), na concentração de 0,16 g/L apresentou efeito letal, com mortalidade de 90% e 75%, respectivamente, após 90 e 106 h da aplicação (THOMAS; CALLAGHAN, 1999).

Em estudo com extrato aquoso de pitanga, *Eugenia uniflora* L. (Mirtaceae) aplicado em discos foliares de couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, foi observada redução de 60% na viabilidade de larvas de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001).

O alcaloide escopolamina, obtido de trombeta, *Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae) adicionado à dieta artificial de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 2,5%, reduziu significativamente a sobrevivência das larvas, para 84%, 54% e 32% nas respectivas concentrações, comparando-se a testemunha (96%) (ALVES; SARTORATTO; TRIGO, 2007). Ainda, de acordo com os autores, o tempo de desenvolvimento também foi aumentado em todas as concentrações, sendo

de 15,20 dias na testemunha e de 20,62 dias, 24,00 dias e 24,00 dias, nas respectivas concentrações avaliadas.

Vieira et al. (2009) avaliaram o efeito de extratos de *Aristolochia lagesiana* (Aristolochiaceae) sobre *A. gemmatalis* e observaram que os tratamentos com extratos de caule/raiz na dosagem de 13,2 µg/inseto e folha, na dosagem de 16,8 µg/inseto, causaram respectivamente, 67 e 60% de mortalidade.

O extrato aquoso de sementes de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) (nim) foi avaliado sobre *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), e provocou alongamento significativo do período larval (17,9 dias) em relação a testemunha (14,9 dias) e redução da sobrevivência larval, com 34,3% das lagartas atingindo a fase de pupa, valor inferior ao registrado na testemunha (80%) (BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010).

Com relação aos produtos fitossanitários naturais utilizados a partir de formulações comerciais, o extrato pirolenhoso, principal constituinte do produto fitossanitário natural Pironat[®], pulverizado sobre discos foliares de couve, na concentração de 5% causou mortalidade significativa de 73,3% de larvas de primeiro ínstar de *P. xylostella*, em comparação com a testemunha (16,7%), na concentração de 10% foi observada mortalidade total das larvas (THULER; DE BORTOLI; BARBOSA, 2007).

Os produtos comerciais a base de nim (Natuneem[®] e Neenseto[®]), avaliados sobre *S. frugiperda*, em laboratório, na concentração de 10 mL/L, causaram mortalidade de 62,9% e 82,9%, respectivamente. Além disso, ambos os produtos provocaram alongamento da fase larval. Nas concentrações de 7,5 mL/L e 10 mL/L de Neenseto[®] apenas 2,86% e 5,71%, dos insetos atingiram a fase adulta, foi observado ainda, pupas e adultos com anomalias (LIMA et al., 2010).

A rotenona constituinte tóxico do extrato de *Derris amazonica* Killip (Leguminosae) apresentou toxicidade para adultos de *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae), causando 100% de mortalidade na concentração de 5% (ALECIO et al., 2010). Ainda, o produto Rotenat CE[®] apresentou efeito sobre a sobrevivência de adultos de *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae), quando aplicado por contato direto/ingestão, ocasionando 71,6% de mortalidade (EFROM et al., 2011).

Quando comparados aos produtos fitossanitários sintéticos os produtos fitossanitários naturais obtidos a partir de plantas inseticidas são mais vantajosos por serem renováveis, e ambientalmente seguros, pois são facilmente degradáveis. Além disso, o desenvolvimento da resistência dos insetos a estas substâncias é lento, não apresentam efeito

residual sobre os alimentos, são seguros aos operadores e de baixo custo, tornando-se uma estratégia acessível aos pequenos produtores (OLIVEIRA et al., 2007). Outro aspecto importante da utilização de produtos fitossanitários naturais é a possibilidade de associação a outros métodos de controle de insetos utilizados no Manejo Integrado de Pragas (TORRES et al., 2006).

Contudo, além da eficiência no controle de pragas, é necessário que os produtos fitossanitários naturais sejam seletivos aos organismos não alvos, possibilitando que entomopatógenos, inimigos naturais e polinizadores sejam preservados (XAVIER, 2009). Mesmo sendo mais seguros que os produtos fitossanitários sintéticos, os produtos fitossanitários naturais também podem agir sobre os agentes de controle biológico, bem como apresentar efeito sobre organismos não alvos associados às culturas (SILVA, 2010).

Entre os agentes de controle biológico é importante conhecer os efeitos dos produtos fitossanitários naturais sobre a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva aeróbica ou facultativamente anaeróbica, com propriedade entomopatogênica, que pode ser encontrada em praticamente todos os ambientes (BOBROWSKI et al., 2003; PRAÇA et al., 2004; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A utilização de bioinseticidas formulados a partir de Bt marcou o início da substituição dos inseticidas convencionais em várias áreas (POLANSCKI, 2004) e, atualmente, é o patógeno mais bem sucedido no controle de insetos pragas (BRAVO et al., 2011).

Isto ocorre porque Bt produz durante o processo de esporulação, cristais compostos por δ -endotoxinas que são específicas aos insetos alvo além de serem inofensivas aos humanos, vertebrados e plantas, e completamente biodegradáveis (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). As δ -endotoxinas são proteínas inseticidas compreendidas em duas famílias multigênicas chamadas Cry e Cyt (MAAGD et al., 2003). Proteínas Cry são especificamente tóxicas a insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera, e também contra outros invertebrados como nematoides. Em contraste as toxinas Cyt são encontradas, principalmente, em subespécies de Bt ativas contra dípteros (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O esporo também apresenta grande importância na patogenicidade dessa bactéria já que sua parede contém proteínas com característica química, sorológica e patogênica semelhantes às proteínas do cristal, além disso, os esporos são fundamentais para insetos em que a suscetibilidade está relacionada à morte por septicemia (HABIB,

ANDRADE, 1998). Assim, a maioria dos produtos comercializados associa esporos e toxinas com a intenção de aumentar sua atividade tóxica (POLANCZYK, 2004).

Com relação aos organismos não alvos destaca-se a abelha africanizada *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). As abelhas são os polinizadores mais importantes da agricultura (KEVAN, 1999). A atividade de polinização contribui para a manutenção da biodiversidade, e assegura a sobrevivência de espécies de plantas, inclusive daquelas que garantem a produção de alimento para humanos e animais, aproximadamente 73% das espécies agrícolas cultivadas no mundo são polinizadas por abelhas (FAO, 2004). Esses polinizadores também contribuem economicamente com a produção de mel, própolis, cera, pólen, geleia real e apitoxinas (WOLFF, 2008).

Como a utilização conjunta de produtos fitossanitários naturais e agentes de controle biológico é promissora no controle de pragas e garante sustentabilidade aos sistemas alternativos de produção é importante se conhecer os efeitos dessa associação. Com relação ao Bt esses produtos podem apresentar efeito negativo sobre cristais e esporos da bactéria reduzindo assim a eficiência do entomopatógeno (SILVA et al., 2012). Ainda de acordo com os autores, os produtos Agro-Mos[®], Biogermex[®], Bovemax, Calda Bordalesa, Ecolife[®], Dalneem[®] e Pironim[®], aplicados juntamente com os esporos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) independente da concentração, afetaram negativamente as UFC/mL, enquanto Stubble-Aid[®] reduziu as UFC/mL de maneira proporcional ao aumento da concentração do produto. Já o produto Mattan Plus[®] não diferiu da testemunha. Dentre os produtos avaliados, apenas a Calda Bordalesa apresentou efeito negativo sobre os cristais de Btk inibindo sua atividade tóxica.

Estudando a bioatividade dos extratos vegetais de colorau, *Bixa orellana* L. (Bixaceae), jambolão, *Syzygium cumini* L (Myrtaceae), uva-do-japão, *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) e mamona, *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) sobre a toxicidade dos cristais de Btk à *A. gemmatilis* não foi observado efeito negativo dos extratos sobre os cristais da bactéria (PESSOA, 2012a).

Do mesmo modo os produtos fitossanitários naturais podem apresentar efeitos de repelência e mortalidade sobre abelhas (XAVIER, 2009). De acordo com o autor produtos fitossanitários naturais a base de rotenona, *Derris* ssp. (Leguminosae), andiroba, *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) extrato de alho, *A. sativum*, óleos de nim, *A. indica*, citronela, *Cymbopogon* spp. (Poaceae) e eucalipto, *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae) foram avaliados sobre operárias adultas de *A. mellifera* provocando mortalidade de cerca de 37%, 20%, 62%, 85%, 50% e 50%, respectivamente.

A utilização conjunta de produtos fitossanitários naturais e Btk pode ser vantajosa principalmente em sistemas alternativos de produção, em função dos efeitos aditivos ou sinérgicos no controle de pragas. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação destes produtos com entomopatógenos, dentro de uma estratégia de manejo de insetos praga, sobretudo com bactérias entomopatogênicas, bem como seus efeitos sobre polinizadores como as abelhas *A. mellifera*.

Nesse sentido, surge a necessidade de se investigar o efeito dos produtos fitossanitários naturais sobre Btk, bem como sobre parâmetros biológicos de *A. gemmatalis*, visando o aprimoramento ou o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas. Além disso, informações sobre a seletividade desses produtos as abelhas *A. mellifera* são importantes para a manutenção destes insetos, bem como do serviço de polinização realizado por eles.

Diante disto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de produtos fitossanitários naturais sobre *A. gemmatalis*, esporos e cristais de Btk e a seletividade a *A. mellifera*.

2 CAPÍTULO I - ATIVIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS SOBRE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki*, E SELETIVIDADE A *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

2.1 RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a atividade de extratos vegetais aquosos de pitanga *Eugenia uniflora* L. (Mirtaceae), pimenta *Capsicum baccatum* var. *pendulum* Willd. (Solanaceae), trombeta *Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae) e uva-do-japão *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) na concentração 5% sobre *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) sobre e esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk) Berliner e a seletividade a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Para esporos, os tratamentos Btk + extratos vegetais e Btk, isoladamente, foram incubados em agitador horizontal (150 rpm, 30 ± 2 °C, 2 h) e, inoculados em meio de cultura ágar nutriente (AN), em placas de Petri. Foram preparadas quatro placas (repetições), acondicionadas em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h), quantificando-se as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Para os cristais, os extratos vegetais e Btk, isoladamente, água destilada esterelizada (testemunha) e Btk + extratos vegetais, após incubação, nas condições descritas acima, foram aplicados sobre cubos de dieta artificial para *A. gemmatalis*, em placas de Petri, que receberam 20 lagartas de segundo ínstar, cada. Foram preparadas quatro placas (repetições), acondicionadas em câmara climatizada (26 ± 2 °C, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase 14 h), avaliando-se a mortalidade após, 24, 48, 72, 96 e 120 h, o percentual de empupamento e emergência e o período ovo-adulto. A seletividade sobre *A. mellifera* foi avaliada pulverizando-se os tratamentos sobre operárias e adicionando-os a pasta Cândi. Como testemunha utilizou-se respectivamente água destilada esterilizada e, pasta Cândi pura. Em ambos os experimentos utilizou-se 30 operárias por tratamento (repetição), individualizadas em tubos de vidro (10 cm \times 2,5 cm), acondicionados em câmara climatizada (25 ± 2 °C, U.R. $70\% \pm 10\%$, fotofase de 12 h) e a mortalidade, avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 h. Verificou-se que os extratos de pitanga, pimenta e uva-do-japão reduziram 100% a formação de UFC/mL. Apenas o extrato de pitanga afetou negativamente a atividade tóxica dos cristais de Btk, causando mortalidade acumulada de 22,89%, valor significativamente menor que o observado na testemunha Btk (85,83%). Nenhum dos extratos afetou a mortalidade, empupamento, emergência e período ovo-adulto de *A. gemmatalis*. Com relação aos diferentes tempos de avaliação não se observou variação para os extratos isolados, entretanto na mistura com Btk o extrato de pitanga retardou significativamente a mortalidade em contrapartida a mortalidade foi acelerada significativamente pelo extrato de pimenta, para os demais não se observou efeito significativo. Apenas o extrato de uva-do-japão reduziu a longevidade de *A. mellifera* de 77,80 h na testemunha para 54,20 h quando aplicado por pulverização. Quando adicionados a pasta Cândi nenhum dos extratos apresentou efeito significativo sobre a longevidade de *A. mellifera*.

Palavras-chave: Bactéria entomopatogênica. Compatibilidade. Controle associado. Extratos vegetais. Organismo não alvo.

2.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the activity of aqueous plant extracts of cherry, *Eugenia uniflora* L. (Mirtaceae), pepper, *Capsicum baccatum* var. *pendulum* Willd. (Solanaceae), trumpet, *Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae) and Blueberry japan, *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) at a concentration of 5% *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) and spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) Berliner and selectivity *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). For spores, the treatment plant extracts and Btk + Btk alone were incubated on horizontal shaker (150 rpm, 30 ± 2 ° C, 2 h) and inoculated onto nutrient agar plates (NA), in petri dishes. We prepared four plates (repetitions), placed in a climatic chamber (30 ± 2 ° C, 18 h), quantifying the colony forming units (CFU) / mL. For crystals, vegetable extracts and Btk alone sterile distilled water (control) and Btk + plant extracts after incubation under the conditions described above were applied on cubes of artificial diet for *A. gemmatalis*, in Petri dishes, which received 20 second instar larvae of each. We prepared four plates (repetitions), placed in a climatic chamber (26 ± 2 ° C, RH $70\% \pm 10\%$ and photoperiod 14 h), evaluating mortality after 24, 48, 72, 96 and 120 h, the empupament and percentage of emergence and egg-adult period. The selectivity of *A. mellifera* was evaluated by spraying treatments on workers and adding them to pasta Candi. As a control we used respectively sterile distilled water and paste Candi pure. In both experiments, we used 30 workers per treatment (repeat), individually in glass tubes (10 cm \times 2.5 cm), packed in a climatic chamber (25 ± 2 ° C, RH $70\% \pm 10\%$, photophase 12 h) and mortality as assessed by one, two, three, four, five, six, nine, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72 and 96 h. It was found that the extracts of cherry, pepper and 100% blueberry japan reduced the formation of CFU / mL. Only the cherry extract negatively affected the toxic activity of Btk crystals, causing cumulative mortality of 22,89%, significantly lower than that observed in the control Btk (85,83%). None of the extracts had affected the mortality empupament, emergence and egg-adult period of *A. gemmatalis*. Regarding different times evaluation no variation was observed for extracts isolated although the mix with Btk cherry extract significantly delayed mortality in contrast, mortality was significantly accelerated by the pepper extract, for others there was no significant effect. Just extract blueberry japan reduced longevity of *A. mellifera* from 77,80 h to 54,20 h in control when applied by spraying. When added to the extracts Pasta Candi no significant effect on the longevity of *A. mellifera*.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Compatibility. Associated control. Plant extracts. Non-target organism.

2.3 INTRODUÇÃO

A utilização de extratos de plantas representa uma estratégia viável para a redução das populações de insetos praga, principalmente em sistemas de produção autossustentáveis que requerem práticas menos agressivas, que façam parte do agroecossistema (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006).

Vários extratos de plantas já foram avaliados sobre lepidópteros, causando diversos efeitos como redução da oviposição (DEQUECH et al., 2009; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010; KNAAK et al., 2012), mortalidade larval (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001; BOIÇA JR. et al., 2005; DEQUECH et al., 2009; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010), prolongamento de fases do ciclo biológico (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001; TORRES et al., 2006; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010; KNAAK et al., 2012), inibição da alimentação (SAITO et al., 2004); mortalidade de ovos (TORRES et al., 2006), redução da fertilidade e ocorrência de anomalias de formação nos adultos (KNAAK et al., 2012), entre outros.

É importante salientar que o efeito inseticida dos extratos vegetais é dependente da concentração do aleloquímico (GAZZONI; HOLSMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997), do estágio de desenvolvimento do inseto (GAZZONI; HOLSMEYER; HOFFMANN-CAMPO, 1997; LIMA et al., 2010), da espécie de inseto, ou seja, da suscetibilidade do inseto praga aos aleloquímicos presentes no extrato, bem como da espécie vegetal utilizada e da forma de extração e aplicação (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001).

Assim estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de demonstrar o potencial de extratos vegetais para o controle de pragas específicas. Para *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), Saito et al (2004) observaram que a espécie *Machaerium hirtum* (Leguminosae) apresentam potencial como inibidora da alimentação de *A. gemmatalis*. Os extratos de *Aristolochia lagesiana* (Aristolochiaceae) nos tratamentos com caule/raiz na dosagem de 13,2 µg/inseto e folha, na dosagem de 16,8 µg/ inseto, causaram respectivamente, 67 e 60% de mortalidade (VIEIRA et al.,2009). Ainda.

Além desses, outros extratos também apresentam potencial para o controle de lepidópteros, entre eles o extrato vegetal aquoso de pitanga, *Eugenia uniflora* L. (Mirtaceae) provocou redução significativa na viabilidade larval que foi de 40% para larvas de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001). Ainda, a sobrevivência de larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) foi

significativamente reduzida pela adição do alcaloide escopolamina, obtido de trombeta, *Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae), a dieta artificial, sendo que na concentração de 2,5%, apenas 32% das larvas sobreviveram (ALVES; SARTORATTO; TRIGO, 2007).

O controle biológico aplicado é uma estratégia que pode ser utilizada concomitantemente ou associada à utilização de extratos vegetais no Manejo Integrado de Pragas, com destaque para a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner, um dos agentes mais empregados nos sistemas alternativos de produção.

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva que durante o processo de esporulação produz proteínas com atividade inseticida. Essas proteínas são especificamente tóxicas a insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera. Além de serem altamente específicas aos insetos alvo, são inofensivas aos humanos, animais vertebrados e plantas e, completamente biodegradáveis (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Entretanto, os produtos fitossanitários naturais podem afetar negativamente os entomopatógenos, inibindo o crescimento vegetativo, a esporulação ou causar mutações genéticas que podem levar a diminuição da virulência a determinada praga (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998), o que pode comprometer a associação dos referidos métodos de controle.

Nesse sentido, a propriedade antibacteriana dos extratos vegetais de manjeriço santo, *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae), orégano, *Origanum majorana* L. (Lamiaceae), canela, *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Lauraceae) e feixo espinhoso, *Xanthoxylum armatum* (Rutaceae) foi avaliada sobre *B. thuringiensis*, apresentando, respectivamente, valores de 12, 8, 8 e 1 mm de diâmetro da zona de inibição, indicando a suscetibilidade da bactéria a esses extratos (JOSHI; LEKHAK; SHARMA, 2009).

Ainda Knaak; Tagliari; Fiuza, (2010) observaram efeito positivo na interação de *B. thuringiensis* subesp. *aizawai* do produto comercial Xentari[®] com extratos vegetais de guiné, *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae), gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), capim-limão, *Cymbopogon citratus* DC Stapf (Poaceae), malva, *Malva silvestris* L. (Malvaceae), carqueja, *Baccharis genistelloides* Person (Asteraceae) e arruda, *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre lagartas de *S. frugiperda*. De acordo com os autores a interação foi positiva, pois ocasionou uma diminuição no tempo letal para essa espécie, por acelerar o processo de destruição das células intestinais.

Os extratos vegetais de pimenta malagueta, *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae), mamão, *Carica papaya* L. (Caricaceae), fumo-bravo, *Solanum granuloso-leprosum* Dun. (Solanaceae), confrei, *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae) e cinamomo, *Melia azedarach* L. (Meliaceae) foram avaliados sobre esporos e cristais de *B. thuringiensis*

subsp. *kurstaki* (Btk) (PESSOA, 2012b). De acordo com o autor apenas o extrato de pimenta não apresentou efeito negativo sobre os esporos, aumentando a formação das UFC/mL, enquanto os demais extratos inibiram 100% da formação de UFC/mL, porém nenhum dos extratos apresentou efeito negativo sobre a toxicidade dos cristais de Btk.

A utilização concomitante ou associada de extratos vegetais e Btk para controle de pragas é promissora, contudo informações a cerca da atividade de extratos vegetais sobre Btk são escassas sendo, portanto, necessários estudos para identificar os efeitos dessa associação visando contribuir para a maior efetividade no controle de pragas principalmente em sistemas alternativos de produção.

Além dos efeitos sobre Btk, os extratos vegetais também podem provocar repelência ou mortalidade em abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), dificultando a prática da apicultura e reduzindo o papel deste polinizador na natureza.

As abelhas, além de contribuírem para a manutenção da biodiversidade por meio do serviço de polinização (FAO, 2004), produzem mel, própolis, pólen, geleia real, cera entre outros produtos (XAVIER, 2009). Esses produtos são explorados pela atividade apícola que é reconhecidamente importante na geração de emprego e renda além de servir como forma de diversificação da propriedade rural, proporcionando benefícios sociais, econômicos e ecológicos (SILVA; PEIXE, 2012).

Embora a utilização de extratos vegetais para o controle de pragas seja menos agressiva ao meio ambiente, pouco se sabe do seu efeito sobre organismos não alvos como *A. mellifera*. Desse modo estudos de seletividade dos extratos vegetais a *A. mellifera* são necessários para a manutenção do papel desse polinizador na natureza.

Assim, esse trabalho teve o objetivo de avaliar a atividade de extratos vegetais aquosos sobre *A. gemmatalis* e esporos e cristais de Btk e a seletividade a *A. mellifera*.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Para a realização dos bioensaios, utilizou-se o produto comercial Thuricide[®], formulado a partir da bactéria *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*.

Os ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos da criação mantida no Laboratório de Controle Biológico da UTFPR-DV e acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 26 ± 2 °C, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase de 14 h, até as lagartas atingirem o segundo ínstar, para a utilização nos bioensaios.

As abelhas *A. mellifera* foram obtidas de colônias do Apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa de Apicultura (UNEPE Apicultura) da UTFPR-DV. Quadros de postura contendo operárias de *A. mellifera* africanizadas, ainda na fase de pupa, foram transportados ao Laboratório de Controle Biológico e acondicionados em sacos de papel Kraft (gramatura 50), lacrados e perfurados. Os sacos foram acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 34 ± 2 °C, U.R. de $60 \pm 5\%$, simulando o ambiente da colônia de origem, com a finalidade de se obter a emergência uniforme das operárias para a utilização nos bioensaios.

2.4.1 Obtenção dos extratos vegetais

Para a obtenção dos extratos, foram utilizadas plantas coletadas no município de Dois Vizinhos, PR (Tabela 1), as coletas foram realizadas no período matutino e, em seguida, amostras desses materiais vegetais foram acondicionadas em sacos de papel Kraft (gramatura 50) e mantidas em estufa de secagem (40 °C) por um período de 48 h, para a desidratação. Uma exsicata de cada exemplar vegetal foi enviada ao Herbário da UTFPR-DV para a identificação botânica e registro de um exemplar *voucher*.

Tabela 1 - Nome científico, família, nome comum e partes das plantas utilizadas para obtenção dos extratos vegetais avaliados nos bioensaios. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Nome Comum	Nome Científico	Família	Parte da planta utilizada
Pimenta dedo-de-moça	<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Solanaceae	Fruto
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i>	Mirtaceae	Folha
Trombeta	<i>Brugmansia suaveolens</i>	Solanaceae	Flor
Uva-do-japão	<i>Hovenia dulcis</i>	Rhamnaceae	Fruto

As plantas secas foram moídas em moinho de facas Tipo *Willye*, até granulometria de 0,5 mm, obtendo-se um pó fino que foi armazenado em recipiente de vidro fechado, mantido em temperatura ambiente e protegido de luminosidade até seu uso na elaboração dos extratos. Como solvente extrator foi utilizada água destilada esterilizada, adicionando-se 5 g de pó em 100 mL de água, permanecendo por 48 h ao abrigo da luz. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro duplo sobre um funil de Buckner conectado a um Kitasato acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm, sendo a solução final armazenada em frascos esterilizados, fechados e, conservados em refrigerador (4 °C) até a utilização nos bioensaios, sendo denominados de “extratos aquosos a 5%”. Estabeleceu-se a concentração de 5% para os extratos vegetais em função da viabilidade de obtenção do material vegetal, uma vez que concentrações maiores requerem quantidades de material vegetal que torna inviável o preparo do extrato.

2.4.2. Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre a Viabilidade de Esporos de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Pesou-se 1 mg do produto comercial Thuricide® e acrescentando-se 10 mL de água destilada esterilizada obtivemos uma suspensão na concentração de $2,3 \times 10^{19}$ esporos/mL, a partir desta suspensão, foram realizadas diluições sucessivas em água destilada esterilizada e, preparada uma suspensão na concentração de $6,2 \times 10^5$ esporos/mL em frascos Erlenmeyer com 50 mL de água destilada esterilizada. Com o auxílio de um micropipetador automático, alíquotas de 300 µL dessa suspensão foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de cada extrato vegetal na concentração original de 5%.

Para cada extrato avaliado foram preparados quatro frascos Erlenmeyer, sendo, cada um, considerado uma repetição. Os frascos foram incubados em agitador horizontal (30 ± 2 °C, 150 rpm por 2 h). Previamente à incubação e ao término desta, foi mensurado o pH. A partir de cada frasco, com o auxílio de um micropipetador automático, a mistura foi inoculada em duas placas de Petri em cinco pontos de 5 µL/ponto, na superfície do meio de cultura ágar nutriente (AN) (ALVES; MORAES, 1998). As placas permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos para evaporação do excesso de água e, em seguida foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de 30 ± 2 °C, por 18 h, sendo posteriormente quantificadas as Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL por ponto.

Como testemunha do experimento, a suspensão de esporos foi adicionada e incubada apenas em água destilada esterilizada e posteriormente inoculada no meio de cultura, conforme descrito.

2.4.3 Determinação da concentração de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* para utilização nos bioensaios

A partir do produto comercial Thuricide[®], na concentração recomendada para o controle de *A. gemmatalis* (300 g/ha/100 L H₂O) foram preparadas sete suspensões nas concentrações de 250, 225, 200, 175, 150, 125 e 100 g/ha/100 L H₂O. Foi preparada a dieta artificial para *A. gemmatalis* (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976; modificada por HOFFMANN-CAMPO; OLIVEIRA, MOSCARDI, 1985), após a solidificação foram cortados cubos de aproximadamente 1,5 cm de lado. Para cada tratamento (concentração) foram preparadas quatro placas de Petri (repetições), com três cubos de dieta, cada. Em cada cubo de dieta, com auxílio de um micropipetador automático, foram adicionados 150 µL das suspensões. A testemunha constou da aplicação de água destilada esterilizada.

Após a aplicação das concentrações as placas permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar, por cinco minutos, para a evaporação do excesso de água, e receberam 25 lagartas de segundo ínstar de *A. gemmatalis* cada. As placas foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada (27 ± 2 °C, UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase 14 h). As avaliações foram realizadas após 24, 48 e 72 h, quantificando-se o número de lagartas mortas, que eram retiradas. A confirmação da mortalidade das lagartas por Btk foi feita observando-se os sinais e sintomas, conforme Habib; Andrade (1998).

2.4.4 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre *A. gemmatalis* e Sobre Cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* *in vivo*

Para a realização do bioensaio 50 mL dos extratos vegetais na concentração de 5% foram colocados, separadamente em frascos Erlenmeyer. Foram preparados frascos Erlenmeyers (tratamentos) contendo os extratos vegetais, a mistura da concentração

predeterminada de Btk e os extratos vegetais, e a mistura de água destilada esterilizada e Btk. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições (frascos), os quais foram incubados em agitador horizontal (30 ± 2 °C, 150 rpm por 2 h). Previamente à incubação e ao término desta, foi mensurado o pH. A testemunha constou de frascos com 50 mL de água destilada esterilizada.

O conteúdo dos frascos Erlenmeyers foi aplicado em cubos de dieta artificial para *A. gemmatalis* como descrito anteriormente no item 2.4.3. Após a secagem, cada placa recebeu 20 lagartas de segundo ínstar de *A. gemmatalis* e, foram acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de 27 ± 2 °C, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase 14 h. Após 72 h da instalação do bioensaio as lagartas sobreviventes foram transferidas das placas de Petri para recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial para *A. gemmatalis*, sem adição dos tratamentos. Foram distribuídas quatro lagartas por recipiente, sendo acondicionados em câmara climatizada nas mesmas condições descritas anteriormente. As avaliações foram realizadas nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 h, quantificando-se o número de lagartas mortas, que foram retiradas. A confirmação da mortalidade por Btk foi feita observando-se os sinais e sintomas, conforme Habib; Andrade (1998).

Após 120 h as lagartas sobreviventes foram avaliadas diariamente observando-se a formação de pupas e a emergência. As pupas formadas foram retiradas dos recipientes plásticos e acondicionadas em tubos de vidro esterilizados (10 cm \times 2,5 cm), retornando à câmara climatizada e mantidas por 480 h para avaliação da emergência e cálculo do período ovo adulto.

Com relação aos dados dos parâmetros percentual de empupamento e percentual de emergência, avaliados para as lagartas sobreviventes, foram utilizadas duas bases de cálculos diferenciadas, denominadas de porcentagem real e relativa. Para o cálculo da porcentagem real de empupamento considerou-se o total inicial de lagartas da repetição, enquanto que para a porcentagem relativa foi considerado o número de lagartas sobreviventes após 120 h da instalação do experimento. Da mesma forma, para os cálculos de emergência, a porcentagem real utiliza o total inicial de lagartas da repetição e para o percentual relativo, o número de pupas formadas em cada repetição.

Em ambos bioensaios (2.4.2 e 2.4.3), quando necessário, os dados foram transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))) e submetidos à análise de variância (teste F), sendo as médias comparadas com as respectivas testemunhas pelo teste de Tukey, a ($p < 0,05$), com auxílio do programa estatístico Bioestat 5.0[®] (AYRES et al., 2007).

2.4.5 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre Operárias Adultas de *A. mellifera*

2.4.5.1 Pulverização dos extratos vegetais

Operárias de *A. mellifera* recém emergidas foram acondicionadas em recipientes plásticos, anestesiadas com CO₂ e transferidas para placas de Petri em grupos de 10 indivíduos. Em seguida, cada placa foi pulverizada com 1 mL dos extratos vegetais à 5%, utilizando-se um aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm. Cada tratamento constou de 30 operárias pulverizadas, as quais foram transferidas, individualmente, para tubos de vidro esterilizados (10 cm × 2,5 cm), sendo cada tubo considerado uma repetição, totalizando 30 repetições por tratamento. Os tubos foram vedados com tecido *voil*, e sobre este foi fornecido alimento constituído de pasta Cândi (açúcar de confeitiro e mel) e um pedaço de algodão embebido em água destilada. A testemunha constou da pulverização de água destilada esterilizada.

Os tubos foram mantidos em câmara climatizada (30 ± 2 °C, U.R. 70 ± 10%, fotofase de 12 h). A mortalidade das operárias foi avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 h após a pulverização dos extratos (BAPTISTA et al., 2009).

Os dados foram transformados em logaritmo e submetidos à análise de sobrevivência e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Assistat (Silva, 2012).

2.4.5.2 Adição dos extratos vegetais em pasta Cândi

Operárias de *A. mellifera*, recém emergidas, foram transferidas para tubos de vidro esterilizados (repetições), conforme descrito no item 2.4.5.1. Os tubos foram vedados com tecido *voil*, e sobre este foi fornecido alimento, que foi composto de pasta Cândi acrescida dos extratos vegetais na concentração de 5% (tratamentos), e um pedaço de algodão embebido em água destilada esterilizada. Foram preparadas duas testemunhas, sendo a primeira composta por pasta Cândi acrescida de água destilada esterilizada e a segunda

composta de pasta Candi pura. As condições experimentais, os parâmetros avaliados e a análise dos dados foram os mesmos descritos no item 2.4.5.1.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos sobre a Viabilidade de Esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Verificou-se que os extratos de pimenta, pitanga e uva-do-japão provocaram 100% de inibição da formação das UFC/mL. No entanto, o extrato de trombeta, mesmo ocasionando redução de 21,50% no número de UFC/mL, não apresentou diferença significativa em relação à testemunha (Tabela 2).

Tabela 2 - Número médio (\pm EP) de UFC/mL de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e extratos vegetais a 5%, inoculados em meio de cultura ágar nutriente em placas de Petri e incubação em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h) e, pH inicial e final. UTFPR, Campus Dois Vizinhos. PR. 2012.

Tratamento	Média UFC/mL($\times 10^5$)	UFC Rel. Test (%) ¹	pH	
			0h	2h
Testemunha	3,35 \pm 1,91 a	--	7,16	6,85
Trombeta	2,63 \pm 0,15 a	- 21, 50	4,86	4,76
Pimenta	0,00 \pm 0,00 b	-100,00	5,16	5,05
Pitanga	0,00 \pm 0,00 b	-100,00	4,45	4,32
Uva-do-japão	0,00 \pm 0,00 b	-100,00	4,96	5,80
P	0,0004			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem, significativamente, entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).¹ Equação: $\frac{\text{Média UFC/ml Trat}}{\text{Média UFC/ml Test}} \times 100 - 100$, sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução de UFC/ml em relação à testemunha.

Os efeitos negativos podem estar relacionados ao pH ácido dos extratos, uma vez que em todos os tratamentos, os valores de pH foram inferiores aos valores observados na testemunha variando entre 4,32 (pitanga) e 5,80 (uva-do-japão). Resultados semelhantes,

relacionados ao pH, foram observados com misturas de produtos fitossanitários naturais comerciais compostos por princípios ativos extraídos de plantas e *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk), nas quais os produtos Biogermex (pH 3,75) e Ecolife® (pH 3,22) reduziram de maneira significativa as UFC/mL em 99,8% e 100%, respectivamente (SILVA, 2010).

Da mesma forma, os produtos fitossanitários naturais Stubble-Aid®, Pironim®, Dalneem®, Ecolife®, Biogermex® e Agro-mos®, em mistura com Btk, apresentaram pH que variou entre 3,47 e 4,77 ocasionaram redução significativa na formação de UFC/mL em, respectivamente, 90,7%, 49,4%, 100%, 100%, 100% e 78,1% quando utilizados na concentração recomendada (SILVA et al., 2012).

Além do possível efeito do pH, a redução das UFC/mL observada nesse estudo pode estar relacionada à composição dos extratos, e conseqüentemente, ao seu modo de ação. De acordo com Silva (2010), os metabólitos secundários encontrados nos extratos podem ocasionar o impedimento da germinação ou a destruição da membrana bacteriana logo após a germinação, efeitos que se relacionam ao potencial antibacteriano dos extratos vegetais.

Nesse sentido, em avaliação das propriedades antibacterianas dos extratos vegetais de manjeriço *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae), manjerona *Origanum majorana*, L. (Lamiaceae), canela *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Lauraceae) e feixo-espinhoso *Xanthoxylum armatum* (Rutaceae) sobre *B. thuringiensis* foi observado zonas de inibição de 12, 8, 1 e 8 mm, respectivamente, demonstrando que a bactéria foi sensível a todos os extratos (JOSHI; LEKHAK; SHARMA, 2009).

Os extratos de pimenta e trombeta apresentam como principais metabólitos secundários os alcaloides (ALVES; SARTORATTO; TRIGO, 2007; LUZ, 2007). Em estudo da atividade antibacteriana de alcaloides obtidos a partir de guaxuma, *Sida acuta* Burm f. (Malvaceae) sobre as bactérias Gram-positivas, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* e *Enterococcus faecalis* e as Gram-negativas *Shigella dysenteriae*, *Salmonella thyphi* e *E. coli* foi observado que as bactérias Gram-positivas apresentaram a formação de maiores diâmetros de halo de inibição quando comparadas as Gram-negativas indicando a maior suscetibilidade aos alcaloides (KAROU et al., 2005). Da mesma forma, em estudo com extrato de pimenta, *Capsicum baccatum* foi observada atividade antibacteriana para as bactérias Gram-negativas *Salmonella enteritidis* e *E. Coli* e Gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis* (CARVALHO; WIEST; CRUZ, 2010). A atividade antibacteriana dos alcaloides, possivelmente está relacionada a sua habilidade de intercalar o DNA e impedir sua síntese através da inibição de enzimas como a topoisomerase II (BONJEAN et al., 1998; COWAN, 1999).

As bactérias Gram-positivas, como *B. thuringiensis*, apresentam uma estrutura celular mais rígida, bem como uma parede celular quimicamente menos complexa e com menor teor de lipídios em relação às Gram-negativas, sendo assim, mais suscetíveis aos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais (LOGUERCIO et al., 2005).

Diferentemente dos resultados observados no presente estudo, Pessoa (2012b) em trabalho sobre o efeito do extrato aquoso de pimenta malagueta, *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae), sobre Btk, verificou que na concentração de 10%, o extrato provocou um aumento na formação de UFC/mL. Essa divergência de resultados pode ser explicada por se tratar de duas espécies diferentes de pimenta, o que possivelmente tenha causado uma variação na presença das substâncias bioativas.

A uva-do-japão apresenta em seus pseudofrutos saponinas, flavonoides e alcaloides (WANDSCHEER et al. 2011). Os flavonoides são compostos derivados do metabolismo secundário das plantas sintetizados em resposta a infecções bacterianas, devido a isso sua atividade como substância antibacteriana foi constatada para diversos microorganismos (COWAN 1999; CUSHNIE; LAMB 2005). De acordo com Tsuchiya et al. (1996), os flavonoides têm capacidade de inativar proteínas extracelulares bem como ocasionar o rompimento da membrana. Cushine; Lamb (2005) descrevem também o efeito de vários flavonoides na inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição do metabolismo de energia e alteração nas funções da membrana plasmáticas de células bacterianas.

Dois flavonoides isolados de tamareira *Tamarix gallica* L. (Tamaricaceae), apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, com halos de inibição que aumentaram proporcionalmente ao aumento da concentração de flavonoides, demonstrando o efeito dos flavonoides sobre essas bactérias (LEFAHAL et al., 2010).

No que se refere a pitanga, os principais fitoquímicos encontrados nas folhas, parte vegetal utilizada no presente estudo para a obtenção dos extratos, são os flavonoides e taninos (AURICCHIO et al., 2007). O extrato vegetal hidroalcoólico dessa planta apresentou atividade bacteriana contra as bactérias Gram-negativas *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. sonnei* e contra as Gram-positivas *S. pyogenes* e *S. aureus*, com halos de inibição de 14, 32, 34, 28 e 24 mm de diâmetro, respectivamente (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

Os taninos isolados do arbusto espinhoso *Dichrostachys cinerea* Wight et Arn. (Fabaceae), apresentaram atividade contra as bactérias Gram-negativas *S. boydii*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* com concentrações inibitórias mínimas de 4,5, 4,0, 5,0, 5,5 e 5,5 mg/mL respectivamente (BANSO; ADEYEMO, 2007). De acordo com Scalbert (1991), as propriedades

antimicrobianas dos taninos se devem aos diferentes mecanismos de ação que incluem a inibição das enzimas extracelulares microbianas, a privação do substrato necessário para o crescimento microbiano, a ação direta sobre o metabolismo através da inibição da fosforilação oxidativa e ainda a complexação de íons metálicos, principalmente o ferro.

2.5.2 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre *A. gemmatalis* e sobre Cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* *in vivo*

A concentração de Btk utilizada para a realização dos bioensaios de atividade dos extratos vegetais sobre a toxicidade dos cristais de Btk e sobre *A. gemmatalis* foi de 50 g de Btk/ha/100 L H₂O, ou seja, metade da menor concentração avaliada em bioensaio preliminar. Optou-se por esta concentração, pois todas as concentrações avaliadas no bioensaio preliminar causaram mortalidade superior a 80%.

Para os extratos vegetais aplicados isoladamente, a mortalidade acumulada para *A. gemmatalis* não diferiu significativamente da testemunha absoluta, indicando que os extratos não apresentam efeito sobre a sobrevivência das lagartas do referido inseto (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem média (\pm EP) da mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *Anticarsia gemmatalis* causada por extratos vegetais a 5%, isoladamente e, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* em diferentes tempos e mortalidade acumulada, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) e pH inicial e final. Temperatura 27 ± 2 °C. 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR. Câmpus Dois Vizinhos. PR. 2012.

Tratamento	Tempo h					Mortalidade acumulada	p	pH	
	24	48	72	96	120			0h	2h
Testemunha	2,50 \pm 2,50 Aa	1,25 \pm 1,25 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	2,50 \pm 1,44 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	7,50 \pm 5,95 b	0,7387	8,14	8,53
Trombeta	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	1,32 \pm 1,32 Ab	1,25 \pm 1,25 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	2,57 \pm 1,48 b	0,5750	4,56	4,5
Btk¹	2,50 \pm 2,50 Ba	35,69 \pm 8,17 Aa	41,25 \pm 5,15 Aa	6,39 \pm 1,21 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	85,83 \pm 3,23 a	0,0001	7,12	6,96
Trombeta +Btk	0,00 \pm 0,00 Ba	33,09 \pm 8,60 Aa	32,50 \pm 12,50 Aa	3,75 \pm 2,39 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	69,34 \pm 9,62 a	0,0001	4,60	4,54
p	0,5912	0,0001	0,0001	0,1880	0,5912	0,0001			
Testemunha	2,50 \pm 2,50 Aa	1,25 \pm 1,25 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	2,50 \pm 1,44 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	7,50 \pm 5,95 b	0,7387	8,14	8,53
Pitanga	2,50 \pm 1,44 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	1,25 \pm 1,25 Ac	2,50 \pm 2,50 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	7,50 \pm 5,95 b	0,7387	4,83	4,78
Btk	2,50 \pm 2,50 Ba	35,69 \pm 8,17 Aa	41,25 \pm 5,15 Aa	6,39 \pm 1,21 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	85,83 \pm 3,23 a	0,0001	7,12	6,96
Pitanga +Btk	1,32 \pm 1,32 Ba	0,00 \pm 0,00 Bb	19,08 \pm 6,99 Ab	2,50 \pm 1,44 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	22,89 \pm 7,64 b	0,0007	4,87	4,85
p	0,9582	0,0001	0,0001	0,2577	0,5912	0,0001			
Testemuha	2,50 \pm 2,50 Aa	1,25 \pm 1,25 Ac	0,00 \pm 0,00 Ab	2,50 \pm 1,44 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	7,50 \pm 5,95 b	0,7387	8,14	8,53
Pimenta	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Ac	0,00 \pm 0,00 Ac	2,50 \pm 1,44 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	3,75 \pm 1,25 b	0,1987	5,36	5,38
Btk	2,50 \pm 2,50 Ba	35,69 \pm 8,17 Ab	41,25 \pm 5,15 Aa	6,39 \pm 1,21 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	85,83 \pm 3,23 a	0,0001	7,12	6,96
Pimenta +Btk	3,75 \pm 2,39 Ca	70,72 \pm 5,55 Aa	19,14 \pm 4,62 Bb	1,25 \pm 1,25 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	94,87 \pm 2,96 a	0,0001	5,40	5,40
p	0,6021	0,0001	0,0001	0,1290	0,4277	0,0001			
Testemuha	2,50 \pm 2,50 Aa	1,25 \pm 1,25 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	2,50 \pm 1,44 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	7,50 \pm 5,95 b	0,7387	8,14	8,53
Uva-do-Japão	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 b	0,8332	5,59	6,01
Btk	2,50 \pm 2,50 Ba	35,69 \pm 8,17 Aa	41,25 \pm 5,15 Aa	6,39 \pm 1,21 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	85,83 \pm 3,23 a	0,0001	7,12	6,96
Uva-do-Japão +Btk	1,25 \pm 1,25 Ba	38,33 \pm 1,67 Aa	32,08 \pm 1,25 Aa	6,19 \pm 2,40 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	77,85 \pm 4,13 a	0,0001	5,68	6,02
p	0,7868	0,0001	0,0001	0,0188	0,4277	0,0001			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹*Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Em avaliação do efeito inseticida de extratos vegetais aquosos sobre *A. gemmatalis*, foi observado que os extratos de cinamomo *Melia azedarach* L. (Meliaceae), e fumo-bravo *Solanum granuloso-leprosum* Dun. (Solanaceae), ocasionaram mortalidade de 69,30% e 76,92%, respectivamente, diferindo, significativamente, da testemunha (34,62%), demonstrando o potencial inseticida desses extratos (PESSOA, 2012b).

No presente estudo o extrato de pitanga, bem como os demais, não apresentou efeito sobre a sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis*. Entretanto, em estudo sobre o efeito de extratos aquosos de plantas sobre *P. xylostella*, observou-se que o extrato aquoso de pitanga causou 60% de mortalidade em larvas (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001).

Essa variação de resultados está relacionada a diferença de suscetibilidade, pois de acordo com Torres, Barros e Oliveira (2001), a suscetibilidade dos insetos pragas aos extratos vegetais é dependente da estrutura e espécie vegetal avaliada, bem como da espécie de inseto alvo.

O extrato de folhas de pitanga apresenta metabólitos secundários como flavonoides e taninos (AURICCHIO et al., 2007). O efeito dos taninos sobre os insetos está relacionado a sua capacidade de ligar-se a proteínas no intestino e inibir sua digestão, além de outros mecanismos de ação como inibição da alimentação, redução na eficiência de utilização dos nutrientes e formação de lesões na camada epidérmica do intestino médio (BARBEHENN; MARTIN, 1994).

Com relação à uva-do-japão, Wandscheer et al. (2011) observaram a presença de saponinas, flavonoides e alcaloides em extratos de pseudofrutos. Em estudo sobre o efeito de saponinas obtidas a partir de raízes de alfafa, *Medicago sativa* L., (Fabaceae) sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera, Noctuidae) foi verificado para as concentrações de 1 ppm e 100 ppm mortalidade total de larvas e pupas de 68% e 90%, respectivamente (ADEL; SEHNAL; JURZYSTA, 2000). De acordo com os autores o efeito das saponinas está relacionado a redução da digestibilidade do alimento ingerido, influenciando na absorção dos nutrientes. Citam, ainda, a inibição de enzimas digestivas e a interferência no metabolismo do esterol, prejudicando a produção dos hormônios que controlam a ecdise nos insetos.

Os extratos de pimenta e trombeta apresentam como principais metabólitos secundários os alcaloides (ALVES; SARTORATTO; TRIGO, 2007; LUZ, 2007). Em estudo realizado com os alcaloides harmalina e ricinina e seu efeito sobre *Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), foi observado que a harmalina e a ricinina, no oitavo dia de avaliação, causaram mortalidade de 93,33 e 82,11%, respectivamente (RIZWAN-UL-HAQ et al., 2009).

A ausência de efeito sobre a sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis* para os extratos de trombeta, pitanga, pimenta e uva-do-japão, avaliados no presente estudo, possivelmente também esteja relacionada a forma de obtenção dos extratos, mais precisamente ao solvente utilizado. Para este estudo utilizou-se água destilada esterilizada como solvente, assim a utilização de outros solventes possa extrair de forma mais eficiente os metabólitos secundários presentes nas partes das plantas utilizadas na obtenção dos extratos.

De acordo com Torres; Barros; Oliveira (2001), a suscetibilidade de insetos pragas aos aleloquímicos obtidos de extratos vegetais apresentam variações em função da forma como são extraídos. A diferença na capacidade de extração de alguns solventes foi demonstrando por Gonçalves-Gervasio (2003) em estudo do efeito de extratos orgânicos e aquoso de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). De acordo com o autor, o extrato clorofórmico foi mais eficiente que os extratos etanólico, metanólico, aquoso e hexânico.

Com relação ao efeito dos extratos sobre Btk, verificou-se que trombeta, pimenta e uva-do-japão não apresentaram efeito negativo sobre a toxicidade dos cristais, já que a mortalidade acumulada para as misturas foi respectivamente de 69,34%, 94,87% e 77,85%, não diferindo significativamente da testemunha Btk (85,83%). No entanto, o extrato de pitanga em mistura com Btk inibiu a ação dos cristais proteicos, uma vez que houve redução significativa na mortalidade acumulada das lagartas de *A. gemmatalis* (22,89%), em comparação com a testemunha Btk, isoladamente (85,83%) (Tabela 3).

A ausência de efeito negativo sobre a toxicidade dos cristais de Btk também foi observada para extratos vegetais de colorau, *Bixa orellana* L. (Bixaceae), jambolão, *Syzygium cumini* L. (Myrtaceae), uva-do-japão, *H. dulcis* e mamona, *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), avaliados sobre *A. gemmatalis* (PESSOA, 2012a).

Em estudo do efeito de extratos vegetais de pimenta malagueta, *C. frutencens*, mamão, *C. papaya*, fumo-bravo, *S. granuloso-leprosum*, confrei, *S. officinale* e cinamomo, *M. azedarach* sobre cristais de Btk foi observado que nenhum dos extratos apresentou efeito negativo sobre a toxicidade dos cristais de Btk (PESSOA, 2012b).

Conforme descrito anteriormente, os extratos de pimenta, trombeta e uva-do-japão apresentam entre seus principais metabólitos secundários os alcaloides. O efeito dos alcaloides harmalina (H) e ricinina (R), isoladamente e combinados com Bt sobre *S. exigua* foram avaliados por Rizwan-ul-haq et al. (2009). De acordo com os autores, isoladamente, a H e a R, ambas na concentração de 1,0 mg/mL, no oitavo dia de avaliação, provocaram mortalidade de 93,33% e 82,11%, respectivamente. Entretanto, na mistura H + Bt a

mortalidade chegou a 96% no quinto dia de avaliação e na mistura de R + Bt foi de 87,82% no sétimo dia, observando-se para a mistura um aumento na porcentagem de mortalidade de *S. exigua* em menor tempo de exposição. Tais resultados corroboram com os observados neste estudo, reafirmando que os alcaloides não apresentaram efeito negativo sobre *B. thuringiensis*.

Todos os extratos utilizados apresentaram pH ácido, que variou entre 4,60 e 5,68, de modo que a inibição da ação tóxica dos cristais observada para o extrato de pitanga não deve estar relacionada a esse fator.

Diante do exposto o efeito negativo do extrato de pitanga sobre a atividade das proteínas do cristal pode estar relacionado aos compostos constituintes desse extrato. Conforme descrito anteriormente, o extrato de folhas de pitanga apresenta flavonoides e taninos (AURICCHIO et al., 2007).

De acordo com Lord; Undeen (1990) os taninos geralmente apresentam a capacidade de se ligar as proteínas de *B. thuringiensis*, principalmente as δ -endotoxinas e enzimas, podendo provocar perda de eficiência. Isso pode ser observado quando o efeito de taninos foi avaliado sobre a toxicidade de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-73 para larvas de *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) de modo que na ausência de taninos a CL₅₀ foi de 27,0 ng/g enquanto que na mistura com taninos na concentração de 3,2 mg/g a CL₅₀ foi de 59,1 ng/g demonstrando que a atividade da δ -endotoxina foi antagonizada, ou possivelmente tenha sido inativada (NAVON; HARE; FEDERICI, 1993).

Quando o extrato de pitanga foi adicionado à dieta artificial de *A. gemmatalis* provocou o escurecimento da dieta, o que remete à presença de taninos no extrato, já que, de acordo com Navon, Hare, Federici (1993), a adição de diferentes concentrações de taninos a dieta artificial para *H. virescens* também provocou o escurecimento da dieta. A presença dos taninos na dieta artificial pode ter provocado, entre outros efeitos já citados anteriormente, a inibição da alimentação (BARBEHENN; MARTIN, 1994), contribuindo assim, para a redução da ingestão dos cristais de Btk.

Com relação ao tempo de mortalidade, os resultados demonstram que para os extratos, isoladamente, não houve diferença significativa de mortalidade entre os tempos. Na mistura com Btk para os extratos de trombeta e uva-do-japão as maiores mortalidades foram observadas nos tempos de 48 h e 72 h, sem diferença significativa entre estes tempos, o mesmo se observa para Btk isoladamente, demonstrando que os extratos não apresentaram efeito sobre os cristais. Na mistura do extrato de pitanga com Btk a maior mortalidade (19,08%) foi observada no tempo de 72 h, diferindo significativamente do Btk isoladamente nesse tempo (41,25%), o que evidencia a inativação de Btk.

Para a mistura do extrato de pimenta com Btk, observou-se diferença significativa entre os tempos de avaliação, de modo que a maior mortalidade ocorreu no tempo de 48 h (70,72%) diferindo significativamente de Btk isoladamente para este tempo (35,69%). A ação mais rápida do entomopatógeno quando misturado ao extrato de pimenta, pode estar relacionado ao efeito estressor do extrato que pode ter levado a praga a adquirir doenças infecciosas, tornando-a mais suscetível às toxinas de Btk (SAITO; LUCHINI, 1998).

Com relação aos dados dos parâmetros percentual de empupamento e percentual de emergência, avaliados para as lagartas sobreviventes, foram utilizadas duas bases de cálculos diferenciadas, denominadas de porcentagem real e relativa. Isto foi necessário devido aos elevados percentuais de mortalidade observados nos tratamentos com Btk e, conseqüentemente o reduzido número de pupas formadas nesses tratamentos, o que impossibilitou também a realização da análise estatística para estes parâmetros.

Nenhum dos extratos vegetais apresentou efeito sobre a formação de pupas de *A. gemmatilis*, sendo que os valores do percentual real de empupamento foram de 73,65%, 60,00%, 60,00%, 53,75% para os extratos de trombeta, pitanga, pimenta e uva-do-japão respectivamente, não diferindo significativamente da testemunha (60,27%). Valores próximos a esses podem ser observados também no percentual relativo de empupamento, sendo respectivamente de 75,52%, 66,35%, 63,16%, 57,17% e testemunha 66,90% (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem média (\pm EP) de empupamento e emergência real e relativa e período ovo-adulto de *Anticarsia gemmatalis* tratada com extratos vegetais aquosos à 5% isoladamente e, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Ti ¹	% vivos ²	% mortos ³	Total real de empupamento (%) ⁴	Total real de emergência (%) ⁴	Total relativo empupamento (%) ⁵	Total relativo de emergência (%) ⁶	Período Ovo-Adulto (dias) ⁷
Testemunha	20	92,40	7,60	60,27 \pm 3,55 a	38,61 \pm 3,06 a	66,90	64,29	24,00
Trombeta	20	97,40	2,60	73,65 \pm 2,70 a	44,54 \pm 11,88 a	75,52	59,87	23,00
Btk⁸	20	14,20	85,80	10,41 \pm 4,73 b	6,39 \pm 3,13 b	62,50	52,08	28,33
Trombeta +Btk	20	30,70	69,30	10,13 \pm 3,54 b	5,07 \pm 2,04 b	53,13	37,05	28,33
p				0,0001	0,0014			
Testemunha	20	92,50	7,50	60,27 \pm 3,55 a	38,61 \pm 3,06 a	66,90	64,29	24,00
Pitanga	20	92,50	7,50	60,00 \pm 9,79 a	41,25 \pm 12,31 a	66,35	56,03	23,10
Btk	20	14,20	85,80	10,41 \pm 4,73 b	6,39 \pm 3,13 b	62,50	52,08	28,33
Pitanga +Btk	20	77,10	22,90	56,91 \pm 6,40 a	21,38 \pm 4,15 ab	80,45	38,08	28,21
p				0,0007	0,0057			
Testemunha	20	92,50	7,50	60,27 \pm 3,55 a	38,61 \pm 3,06 a	66,90	64,29	24,00
Pimenta	20	96,20	3,80	60,00 \pm 13,38 a	41,25 \pm 10,08 a	63,16	68,08	24,21
Btk	20	14,20	85,80	10,41 \pm 4,73 b	6,39 \pm 3,13 b	62,50	52,08	28,33
Pimenta +Btk	20	5,10	94,90	5,13 \pm 2,96 b	2,50 \pm 2,5 b	50,00	25,00	28,00
p				0,0005	0,0004			
Testemunha	20	92,50	7,50	60,27 \pm 3,55 a	38,61 \pm 3,06 a	66,90	64,29	24,00
Uva-do-Japão	20	100,00	0,00	53,75 \pm 11,43 a	22,50 \pm 5,95 ab	57,17	39,08	23,24
Btk	20	14,20	85,80	10,41 \pm 4,73 b	6,39 \pm 3,13 b	62,50	52,08	28,33
Uva-do-Japão +Btk	20	22,10	77,90	19,76 \pm 3,54 b	4,88 \pm 1,95 b	91,67	25,00	28,00
p				0,0010	0,0013			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ¹ - Total inicial - número de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* utilizadas em cada repetição de todos os tratamentos; ² - Porcentagem de lagartas vivas após 120 h de avaliação; ³ - Porcentagem de lagartas mortas após 120 h de avaliação; ⁴ Percentual referente ao total inicial de lagartas de cada tratamento; ⁵ Percentual referente ao total de lagartas vivas após 120 h de avaliação; ⁶ Percentual referente ao total de pupas formadas em cada tratamento; ⁷ - Não foi possível realizar a análise estatística devido a insuficiência dos dados; ⁸ - *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Nos tratamentos com a mistura dos extratos de trombeta, uva-do-japão e pimenta com Btk verificou-se redução significativa na taxa real de empupamento, ocasionada pela alta mortalidade larval, como comentado anteriormente, exceto para a mistura de extrato de pitanga e Btk (56,91%) que diferiu significativamente do Btk (10,41%). Contudo o percentual real de empupamento das lagartas de *A. gemmatalis* para o extrato de pitanga na mistura com Btk não diferiu significativamente da testemunha (60,27%). Esses resultados confirmam a inibição da atividade tóxica dos cristais de Btk pelo extrato de pitanga observada nos dados de mortalidade (Tabela 4).

Por outro lado, no que se refere ao percentual relativo de empupamento, para a mistura dos extratos com Btk, observou-se valores de 53,13% para trombeta, 80,45% para pitanga, 50,00% para pimenta, 91,67% para uva-do-japão e 62,50% para Btk. Esses resultados evidenciam a ausência de efeitos secundários dos extratos vegetais quando associados aos cristais de Btk sobre a formação de pupas, uma vez que apresentaram valores percentuais semelhantes ao observado na testemunha absoluta (66,90%)

A interação entre *B. thuringiensis* subesp. *aizawai* (Xentari[®]) e os extratos vegetais de guiné, *Petiveria alliaceae* L. (Phytolacaceae), gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), capim-limão, *Cymbopogon citratus* DC Stapf (Poaceae), malva, *Malva silvestris* L. (Malvaceae), carqueja, *Baccharis genistelloides* Person (Asteraceae) e arruda, *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre lagartas de *S. frugiperda*, foi positiva uma vez diminuiu o tempo letal para essa espécie por acelerar o processo de destruição das células intestinais (KNAAK; TAGLIARI; FIUZA, 2010).

Os percentuais de emergência real, para os extratos isoladamente, foram de 44,54% para trombeta, 41,25% para pitanga, 41,25% para pimenta e 22,50% para uva-do-japão, os quais não diferiram da testemunha (38,61%), não havendo influência dos extratos sobre a emergência dos adultos (Tabela 4).

Além de não apresentarem toxicidade direta sobre *A. gemmatalis* os extratos avaliados no presente estudo, também não causaram efeito secundário sobre as lagartas, isso possivelmente deva-se a ausência de susceptibilidade do inseto alvo aos metabólitos presentes no extrato ou ainda esteja relacionado a capacidade de extração do solvente utilizado que resultou em baixa concentração dos metabolitos no extrato, conforme mencionado anteriormente.

Diferenças na concentração podem ocasionar resultados diferentes para a mesma espécie alvo avaliada conforme demonstrado por Maroneze; Gallegos (2009) para o extrato de *M. azedarach*. De acordo com os autores nas concentrações de 1,0% e 5,0% o

extrato causou 100% de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, contudo quando avaliado na concentração de 0,1% não apresentou efeito significativo sobre a mortalidade e observou-se 100% de emergência das pupas formadas.

Para o parâmetro emergência real na mistura com Btk nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa com Btk (6,39%), observando-se valores de 5,07%, 21,38%, 2,50% e 4,88%, respectivamente para os extratos de trombeta, pitanga, pimenta e uva-do-japão (Tabela 4).

O reduzido número de indivíduos emergidos nos tratamentos contendo Btk impossibilitou a realização da análise estatística para o parâmetro período ovo-adulto. Os valores, em dias, para estes tratamentos foram de 28,33 para trombeta, 28,21 para pitanga, 28,00 para pimenta e 28,00 para uva-do-japão e 28,33 para Btk, isoladamente. Os valores do período ovo-adulto, supracitados foram maiores comparando-se aos extratos, isoladamente, sendo trombeta (23,00 dias), pitanga (23,10 dias), pimenta (24,21 dias), uva-do-japão (23,24 dias) e testemunha (24,00 dias) (Tabela 4). De modo que isoladamente os extratos vegetais não ocasionaram alterações expressivas nos valores de período ovo-adulto.

Contudo a alteração desse parâmetro foi observada para *S. littoralis* submetidas a dietas contendo saponinas (ADEL; SEHNAL; JURZYSTA, 2000). De acordo com os autores o período de desenvolvimento foi aumentado significativamente de 28,6 dias no controle para 34,6 dias e 41,9 dias, respectivamente.

De modo semelhante o alcaloide escopolamina obtido de *B. suaveolens* adicionado à dieta artificial de *S. frugiperda*, nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 2,5%, aumentou significativamente o tempo de desenvolvimento sendo de 15,20 dias na testemunha e de 20,62 dias, 24 dias e 24 dias, nas respectivas concentrações avaliadas (ALVES; SARTORATTO; TRIGO, 2007).

O alongamento do período larval também foi observado para *T. absoluta* alimentada com folhas de tomateiro resistente a praga, tratadas com *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*. Para larvas de segundo ínstar observou-se período larval de 10,7 dias sem Btk e 12 dias com Btk (GIUSTOLIN et al. 2001).

Mesmo não sendo possível a realização da análise estatística, com base nas diferenças entre os valores observados para o período ovo-adulto entre todos os tratamentos, infere-se a atividade biológica de Btk na alteração desse parâmetro. Segundo Polanczyk (2004), além da patogenicidade e virulência de *B. thuringiensis* aos insetos, outros aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, embora difíceis de detectar, certamente ocorrem e representam um importante parâmetro que auxilia na avaliação de sua

atividade tóxica.

De acordo com Torres; Barros; Oliveira (2001) o alongamento do período ovo-adulto, juntamente com a mortalidade da fase larval, é um efeito fundamental para um agente de controle, pois pode aumentar o tempo de exposição da praga aos inimigos naturais, e reduzir o crescimento populacional e as populações subsequentes através do aumento do tempo médio de cada geração.

Desse modo a eficiência de um agente de controle está relacionada ao seu efeito direto, que se constitui na mortalidade das larvas e, indiretos aumentando o tempo de exposição ao ataque de parasitoides, predadores e entomopatógenos (KNAAK et al., 2012).

Além de constituírem-se em estratégia importante para o Manejo Integrado de Pragas, a associação de extratos vegetais, também pode contribuir para o manejo da resistência de insetos praga a *B. thuringiensis* (SILVA 2010), uma vez que o intestino dos insetos desempenha importante papel na detoxificação dos produtos do metabolismo secundário das plantas e essa habilidade pode ser afetada pelas toxinas de Btk e por isso a capacidade do inseto em metabolizar esses produtos pode ser afetada, resultando em um aumento da suscetibilidade a esses produtos. (GILL, 1995).

Além disso, outro possível efeito da associação de Btk com extratos vegetais esteja relacionado ao efeito estressor do extrato que pode levar a praga a adquirir doenças infecciosas, tornando-o mais suscetível as toxinas de Btk (SAITO; LUCHINI, 1998).

2.5.3 Atividade dos Extratos Vegetais Aquosos Sobre Operárias Adultas de *A. mellifera*

2.5.3.1 Pulverização dos extratos vegetais

As operárias adultas de *A. mellifera* pulverizadas com o extrato de uva-do-japão apresentaram a menor longevidade (54,20 h), diferindo significativamente da testemunha (77,80 h). Os demais extratos não causaram redução significativa da longevidade com valores variando de 59,50 h (pitanga) a 85,90 h (trombeta). (Tabela 5).

Tabela 5 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após pulverização de extratos vegetais à 5%. Temperatura 30 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Longevidade (h)
Testemunha	77,80 \pm 7,17 a
Trombeta	85,90 \pm 7,97 a
Pitanga	59,50 \pm 5,78 ab
Pimenta	64,20 \pm 6,11 ab
Uva-do-japão	54,20 \pm 5,33 b
CV %	14,35

Dados transformados em Logaritmo. Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem

A maior toxicidade do extrato de uva-do-japão possivelmente esteja relacionado a presença de saponinas, flavonoides e alcaloides (WANDSCHEER et al. 2011) e ao modo de ação desses compostos. O efeito das saponinas sobre insetos está relacionado a redução da digestibilidade do alimento ingerido influenciando na absorção dos nutrientes, inibição de enzimas digestivas e a interferência no metabolismo do esterol prejudicando a produção dos hormônios que controlam a ecdise nos insetos (ADEL; SEHNAL; JURZYSTA, 2000).

Já os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, agem sobre os insetos causando a precipitação de proteínas que resulta no bloqueio da alimentação, se ligam com proteínas e enzimas digestivas inibindo a digestão (APPEL, 1993). O autor também descreve que a oxidação dos compostos fenólicos resulta na liberação de radicais de hidroxila que apresentam ação tóxica, pois são responsáveis pelo rompimento da integridade da membrana e provocam distúrbios de metabolismo no epitélio intestinal.

O flavonoide astilbina obtido a partir de extratos de flores, pedúnculos e casca do tronco de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae) e incorporados na dieta artificial de *A. mellifera* reduziram, significativamente, a sobrevivência médias das abelhas em 12 dias para flores e pedúnculos e 8 dias para casca do tronco, enquanto a testemunha sobreviveu entre 22 e 25 dias (CINTRA et al., 2002).

Resultados semelhantes aos observados neste estudo foram verificados para o alcaloide ricinina, obtido a partir do extrato foliar de mamona *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), aplicado de maneira tóxica, na concentração de 0,02%, sobre operárias adultas de *A. mellifera*, o qual ocasionou redução significativa da sobrevivência média de 13 dias na testemunha para 11 dias no tratamento (ROTHER et al., 2009). De acordo com Farah et al. (1988), o principal efeito desse alcaloide está relacionado a inibição da cadeia

respiratória.

O efeito negativo dos alcaloides sobre insetos, principalmente da ordem Lepidoptera, também pode ser observado para o alcaloide escopolamina sobre *S. frugiperda* (ALVES; SARTORATTO; TRIGO, 2007). De acordo com os autores, a adição do alcaloide à dieta artificial reduziu significativamente a sobrevivência das larvas e aumentou o tempo de desenvolvimento. Do mesmo modo os alcaloides harmalina e ricinina reduziram significativamente a sobrevivência de lagartas de *S. exigua* (RIZWAN-UL-HAQ et al., 2009).

2.5.3.2 Adição dos extratos vegetais em pasta Cândi

Nenhum dos extratos vegetais causou redução na longevidade de adultos de *A. mellifera* quando adicionados à pasta Cândi, com variação de 83,57 h (pimenta) a 95,97 h (uva-do-japão) (Tabela 6).

Tabela 6 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após fornecimento de pasta Cândi acrescida de extratos vegetais à 5%. Temperatura 30 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Longevidade (h)
Testemunha A ¹	80,20 \pm 9,42 a
Testemunha B ²	84,30 \pm 11,58 a
Trombeta	89,40 \pm 12,54 a
Pitanga	86,60 \pm 8,88 a
Pimenta	83,57 \pm 13,39 a
Uva-do-japão	95,97 \pm 11,90 a
CV %	20,28

Dados transformados em Logaritmo. Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).¹ Adição de água destilada esterilizada à pasta Cândi; ² Pasta Cândi Pura

Em estudo do efeito do alcaloide nicotina, extraído de flores de *Nicotiana* spp. (Solanaceae), adicionado a sacarose e fornecido como alimento à operárias adultas e larvas de *A. mellifera*, observou-se que não houve efeito sobre a sobrevivência das abelhas, porém, para larvas na concentração de 50 ppm observou-se 70% de mortalidade, diferindo

significativamente da testemunha (35%) (SINGARAVELAN et al. 2006). Esse resultado corrobora com o observado no presente estudo para os extratos de pimenta e trombeta, plantas também pertencentes a família Solanaceae, e que apresentam como metabólitos principais os alcaloides.

Por outro lado, o alcaloide ricinina, isolado a partir do extrato foliar de mamona adicionado a pasta Cândi nas concentrações de 0,05% e 0,1% reduziu significativamente a sobrevivência, sendo de 15 dias, em ambas as concentrações, enquanto que para a testemunha a longevidade foi de 18 dias (ROTHER et al., 2009). Conforme citado anteriormente esse alcaloide atua como inibidor da cadeia respiratória (FARAH et al. 1988). Rother et al. (2009), utilizaram o alcaloide ricinina puro, o que possivelmente explica essa variação de resultados.

É importante salientar que além da utilização de produtos que apresentem seletividade fisiológica, ou seja, produtos que sejam inócuos as abelhas, também se garanta a seletividade ecológica. Esta se dá por meio da aplicação dos extratos vegetais ao final do período da tarde, horário em que as abelhas apresentam uma menor taxa de forrageamento, do fechamento da colmeia e da realização da alimentação artificial durante as pulverizações (FOERSTER, 2002; XAVIER 2009).

Os extratos avaliados no presente estudo não apresentaram efeito direto sobre o desenvolvimento de *A. gemmatalis*, contudo isso não implica em descartar essas plantas, pois as mesmas apresentam metabólitos secundários com conhecido efeito inseticida. Assim possivelmente a água como solvente extrator no presente estudo, pode não ter extraído os metabólitos em concentração suficiente ou então a concentração utilizada não foi suficiente. De modo que, resultados diferentes podem ser obtidos a partir da utilização de outras concentrações ou outros solventes para a extração dos metabólitos secundários.

A associação dos extratos vegetais de trombeta, pimenta e uva-do-japão com Btk não afetou a toxicidade dos cristais, diferentemente do observado para esporos. De acordo Silva et al. (2012), a decisão de fazer uso de um entomopatógeno deve levar em consideração não somente sua capacidade de reduzir a população do inseto-alvo, mas também a persistência no ambiente. Embora se tenha conhecimento que Btk não é um patógeno epizoótico, é importante destacar que a utilização conjunta de todos os extratos avaliados neste estudo pode comprometer a reciclagem da bactéria em campo, pois os mesmos afetaram negativamente os esporos.

Contudo, a associação de todos os extratos vegetais com Btk resultou em um efeito subletal importante, o alongamento do período ovo-adulto de *A. gemmatalis*. De acordo

com Polanczyk (2004), os efeitos subletais de *B. thuringiensis* representam um importante parâmetro que auxilia na avaliação de sua atividade tóxica.

Assim a associação dos extratos vegetais de trombeta, pimenta e uva-do-japão com Btk, mesmo afetando os esporos, pode ser positiva no controle de insetos praga, pois os extratos não apresentam efeito negativo sobre os cristais de Btk e a utilização conjunta provoca o alongamento do período ovo-adulto que segundo Torres, Barros; Oliveira (2001) esse alongamento aumenta o tempo de exposição da praga aos inimigos naturais, reduz o crescimento populacional e as populações subsequentes.

Contudo torna-se necessário o desenvolvimento de outras pesquisas a campo para que se possa verificar se o efeito sobre os esporos observado em laboratório representa um obstáculo para a utilização conjunta dos extratos vegetais de trombeta, pimenta e uva-do-japão com Btk para o controle de insetos praga.

É importante resaltar também que apenas o extrato de uva-do-japão foi tóxico a operárias adultas de *A. mellifera* quando aplicado por pulverização. Assim o extrato de uva-do-japão não deve ser utilizado para o controle de pragas pois não foi seletivo a *A. mellifera*.

Ainda com relação a seletividade dos demais extratos sugere-se a realização de novos experimentos que avaliem os efeitos sobre as abelhas em ambiente de campo, os efeitos sobre a estruturação da colônia e a toxicidade para operárias em diferentes idades, pois mesmo não sendo tóxicos a operárias adultas diferentes efeitos podem ser observados sobre esses parâmetros.

2.6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pôde-se concluir que:
Nenhum dos extratos avaliados apresentou efeito inseticida para *A. gemmatalis*.

Os extratos de pitanga, pimenta e uva-do-japão com *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* inibiram formação de UFC/mL.

A toxicidade dos cristais de Btk foi afetada apenas pelo extrato de pitanga.

O extrato de uva-do-japão foi tóxico aos adultos de *A. mellifera* quando pulverizado.

Nenhum dos extratos vegetais apresentou efeito tóxico aos adultos de *A. mellifera* quando adicionados à pasta Cândia.

3 CAPÍTULO II - ATIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS NATURAIS COMERCIAIS SOBRE *Anticarsia gemmatalis* HUBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki* E SELETIVIDADE A *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

3.1 RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos produtos fitossanitários naturais comerciais (PFNC) Natuneem[®], Natualho[®], Pironat[®], Rotenat[®] e Calda Bordalesa, na concentração recomendada pelo fabricante, sobre *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk) e a seletividade a *Apis mellifera*. A atividade sobre os esporos foi avaliada misturando-se Btk e os PFNC e Btk e água destilada esterilizada (testemunha) incubando-se em agitador horizontal (150 rpm, 30 ± 2 °C, 2 h) e, em seguida inoculando-se em meio de cultura ágar nutriente (AN) em placas de Petri. Para cada tratamento foram preparadas quatro placas (repetições), que foram acondicionadas em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h), quantificando-se as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Para os cristais, os tratamentos constaram de PFNC puros, água destilada esterilizada (testemunha), Btk e a mistura de cada PFNC com Btk que depois de incubados, nas mesmas condições descritas acima, foram aplicados sobre cubos de dieta artificial para *A. gemmatalis*, em placas de Petri que receberam 20 lagartas de segundo ínstar. Para cada tratamento foram preparadas quatro placas (repetições) as quais foram acondicionadas em câmara climatizada (26 ± 2 °C, UR: 70% ± 10% e fotofase 14 h) avaliando-se a mortalidade após 24, 48, 72, 96 e 120 horas, o percentual de empupamento, emergência e duração do período ovo-adulto. A seletividade sobre *A. mellifera* foi avaliada pulverizando-se os PFNC sobre grupos de 10 operárias e adicionando-os ao alimento constituído de pasta Cândi. Em ambos os experimentos foram utilizadas 30 operárias por tratamento (repetição), individualizadas em tubos de vidro e, para as respectivas testemunhas utilizou-se a pulverização de água destilada esterilizada, e a adição de pasta Cândi pura ou acrescida de água destilada esterilizada, no segundo experimento. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada (25 ± 2 °C, U.R. 70% ± 10%, fotofase de 12 h) e a mortalidade das operárias avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 horas. Observou-se que os produtos Natuneem[®] e Rotenat[®] aumentaram as UFC/mL em 140,00% e 123,20%, respectivamente, os demais produtos não diferiram significativamente da testemunha. Apenas a Calda Bordalesa afetou a atividade tóxica dos cristais de Btk causando mortalidade acumulada de 2,50% percentual significativamente menor que o observado na testemunha Btk (98,68%). Apenas a Calda Bordalesa e o Natualho[®] reduziram significativamente o empupamento, e a Calda Bordalesa e o Natuneem[®] reduziram significativamente a emergência, os demais parâmetros não foram afetados. Para *A. mellifera* não se observou variações significativas na longevidade para as duas formas de aplicação avaliadas.

Palavras-chave: Bactéria entomopatogênica. Controle associado. Compatibilidade. Produtos comerciais. Organismo não alvo.

3.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of natural commercial products phytosanitary (NCP) Natuneem[®], Natualho[®], Pironat[®], Rotenat[®] Bordeaux mixture, the concentration recommended by the manufacturer of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) and the selectivity to *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). The activity on the spores was evaluated by mixing Btk and NCP and Btk and sterile distilled water (control) and incubated on horizontal shaker (150 rpm, 30 ± 2 ° C, 2 h), then inoculated in the midst of nutrient agar (NA) in Petri dishes. For each treatment were prepared four plates (repetitions), which were placed in an incubator (30 ± 2 ° C, 18 h), quantifying the colony forming units (CFU) / mL. For crystals, treatments consisted of NCP pure, sterile distilled water (control), Btk and mix with each NCP Btk that after incubated in the same conditions described above were applied to artificial diet cubes *A. gemmatilis* in Petri dishes receiving 20 second instar larvae. For each treatment were prepared four plates (repetitions) which were placed in an incubator (26 ± 2 ° C, RH 70% ± 10% and photoperiod 14 h) evaluating mortality after 24, 48, 72, 96 and 120 hours, the percentage of empuapament, emergency and duration of the egg-adult. The selectivity of *A. mellifera* was evaluated by spraying the NCP on groups of 10 workers and adding them to food consisting of pasta Candi. In both experiments, 30 workers were used per treatment (repetition) in individual glass tubes, and to the respective controls, we used the spray of sterile distilled water, and adding pure pulp or Candi plus sterile distilled water, the second experiment. The experiments were kept in an incubator (25 ± 2 ° C, RH 70% ± 10%, 12-h photoperiod) and mortality of workers assessed a, two, three, four, five, six, nine, 12, 15; 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72 and 96 hours. It was observed that products Natuneem[®] and Rotenat[®] increased the CFU / mL 140,00% and 123,20% respectively and the other products did not differ significantly from the control. Just Bordeaux mixture affected the toxic activity of Btk crystals causing cumulative mortality of 2,50% percentage significantly lower than that observed in the control Btk (98,68%). Just Bordeaux mixture and Natualho[®] the reduced significantly the empuapament, Bordeaux mixture and Natuneem[®] significantly reduced the emergence, the other parameters were not affected. To *A. mellifera* there was no significant variation in longevity for both forms of application evaluated.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Associated control. Compatibility. Commercial products. Non-target organism.

3.3 INTRODUÇÃO

O estado do Paraná é o segundo maior produtor de orgânicos do Brasil e uma das principais culturas é a soja (SEIM, 2009). Nesses sistemas alternativos de produção o controle de pragas, entre elas a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), pode ser realizado por meio da adoção de estratégias importantes como a utilização de produtos fitossanitários naturais, obtidos a partir de substâncias secundárias, presentes em plantas inseticidas (VASCONCELOS; JUNIOR; BARROS, 2006) e agentes de controle biológico (PENTEADO, 2007).

Com relação aos produtos fitossanitários naturais, poucas são as informações a respeito dos seus efeitos sobre *A. gemmatalis*. Entre os agentes de controle biológico, destaca-se *Bacillus thuringiensis*. Essa bactéria Gram-positiva produz proteínas inseticidas, especialmente tóxicas a insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Sendo o patógeno mais bem sucedido no controle de insetos praga (BRAVO et al., 2011).

Os produtos fitossanitários naturais apresentam como vantagem a possibilidade de serem utilizados em associação com outros métodos de controle de insetos, principalmente o controle biológico, utilizados no Manejo Integrado de Pragas (TORRES et al., 2006; SILVA et al., 2012) por serem menos tóxicos do que os produtos convencionais.

Contudo, é importante salientar que os produtos fitossanitários podem atuar sobre os entomopatógenos inibindo o crescimento vegetativo e a esporulação, causando mutações genéticas que podem levar a diminuição da virulência a determinada praga (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998). Nesse sentido, quando utilizados em associação, é importante que os produtos fitossanitários naturais sejam compatíveis com outras estratégias de manejo, principalmente com o controle biológico (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004).

Em estudo referente ao efeito de produtos alternativos sobre esporos e cristais do *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk), foi observado que os produtos Biogermex, Ecolife[®], Calda Sulfocálcica e Natural neem apresentaram efeito negativo sobre os esporos, quando aplicados de maneira conjunta, pois reduziram significativamente a formação de UFC/mL. Por outro lado, os produtos Planta Clean, Supermagro e Bion[®] aumentaram significativamente o número de UFC/mL, enquanto Mattan Plus, Pironim e Extrato de Crisântemo não diferiram da testemunha. Com relação aos efeitos sobre os cristais os produtos Bion[®], Planta Clean e Ecolife[®] foram antagonistas a ação das toxinas dos cristais,

enquanto que Extrato de Crisântemo, Calda Sulfocálcica, Biogermex, Mattan Plus, Supermagro e Pironim apresentaram efeito aditivo (SILVA, 2010).

De modo semelhante, Silva et al., (2012) observaram que os produtos Agro-Mos[®], Biogermex[®], Bovemax, Calda Bordalesa, Ecolife[®], Dalneem[®] e Pironim, aplicados juntamente com os esporos de Btk, independente da concentração, afetaram negativamente a formação das UFC/mL, enquanto Stubble-Aid[®] reduziu as UFC/mL, proporcionalmente ao aumento da concentração do produto. Já o produto Mattan Plus[®] não diferiu da testemunha. De acordo com os autores entre os produtos avaliados, apenas a Calda Bordalesa apresentou efeito negativo sobre os cristais de Btk, inibindo sua atividade tóxica.

Além de compatíveis é fundamental que esses métodos de controle sejam seletivos a organismos não alvos. Com a utilização de agentes de controle biológico, bem como de produtos fitossanitários naturais comerciais em sistemas alternativos de produção, surge a preocupação com a seletividade desses agentes de controle sobre organismos não-alvos, entre os quais a abelha africanizada *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).

Por meio da polinização as abelhas contribuem para a manutenção da biodiversidade e asseguram a sobrevivência de espécies de plantas, inclusive plantas que garantem a segurança alimentar de inúmeras famílias rurais (FAO 2004). As abelhas também são importantes produtoras de mel, própolis, cera, pólen, geleia real e apitoxinas, produtos que são utilizados direta ou indiretamente pelo homem (WOLFF, 2008).

Em estudo sobre o efeito de produtos fitossanitários naturais sobre organismos não alvo avaliou-se a toxicidade dos inseticidas botânicos a base de rotenona *Derris* ssp. (Leguminosae), andiroba *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae), extrato de alho *Allium sativum* L. (Liliaceae) e óleos de nim *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), citronela *Cymbopogon* ssp. (Poaceae) e eucalipto *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae) sobre adultos de *A. mellifera* (XAVIER, 2009). Segundo o autor o óleo de nim foi o mais tóxico causando cerca de 85% de mortalidade após seis dias de exposição, enquanto o óleo de andiroba foi o menos tóxico, ocasionando cerca de 20% de mortalidade. Já o extrato de alho, a rotenona e os extratos de citronela e eucalipto causaram cerca de 62%, 37%, 50% e 50% de mortalidade respectivamente.

Embora estudos de seletividade para produtos fitossanitários naturais comerciais sejam escassos, são de fundamental importância na determinação da segurança a organismos não-alvo, como *A. mellifera*. Esses estudos possibilitam a definição de estratégias de manejo buscando o benefício conjunto dos produtos fitossanitários naturais comerciais e da polinização para as culturas de modo geral.

Da mesma forma, a investigação da atividade de produtos fitossanitários naturais comerciais a agentes de controle biológico, como *B. thuringiensis* é de extrema importância para o estabelecimento de estratégias de manejo. De acordo com Alves; Pinto (2003), isto ocorre, sobretudo para casos em que se observa simultaneamente a presença de insetos suscetíveis e não suscetíveis a um dos métodos de controle, além de espécies ou estágios de desenvolvimento diferentes. Além disso, a associação positiva entre produtos fitossanitários naturais e *B. thuringiensis* pode ser vantajosa para controlar populações de insetos pragas com resistência ao Bt (SINGH; RUP; KOUL, 2007), pois ocorre a ação de mais de um princípio ativo com diferentes modos de ação.

Nesse contexto, este trabalho teve o objetivo de avaliar a atividade de produtos fitossanitários naturais comerciais sobre *A. gemmatalis* e sobre esporos e cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* e a seletividade a *A. mellifera*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Para a realização dos bioensaios, utilizou-se o produto comercial Thuricide[®], formulado com a bactéria *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*.

Os ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos da criação mantida no Laboratório de Controle Biológico da UTFPR-DV e acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 26 ± 2 °C, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase de 14 h até as lagartas atingirem o segundo ínstar, para a utilização nos bioensaios.

As abelhas *A. mellifera* foram obtidas de colônias do Apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa de Apicultura (UNEPE Apicultura) da UTFPR-DV. Quadros de postura contendo operárias de *A. mellifera* africanizadas, ainda na fase de pupa, foram transportados ao Laboratório de Controle Biológico e acondicionados em sacos de papel Kraft (gramatura 50), lacrados e perfurados. Os sacos foram acondicionados em câmara climatizada à temperatura de 34 ± 2 °C, U.R. de $60 \pm 5\%$, simulando o ambiente da colônia de origem, com a finalidade de se obter a emergência uniforme das operárias para a utilização nos bioensaios.

Os produtos fitossanitários naturais comerciais (PFN) foram obtidos em casas especializadas em insumos para sistemas alternativos de produção, sendo avaliados nas

concentrações recomendadas (CR) pelos fabricantes (Tabela 7).

Tabela 7 - Nome comercial, composição, recomendação de uso e concentração recomendada dos produtos fitossanitários naturais utilizados nos experimentos. UTFPR, Câmpus Doiz Vizinhas, PR, 2012.

Nome Comercial	Composição	Recomendação de uso	Concentração Recomendada
Naturalho [®]	Extrato de alho	INS	3 mL/ 1 L
Natuneem [®]	Óleo de nim, revigorante orgânico, óleo de mamona, extratos vegetais bioativos e veículo Extrato de <i>Derris</i> sp e ácidos graxos, princípio ativo rotenona	INS	0,5 mL/ 1 L
Rotenat [®]		INS	6 mL / 1 L
Pironat [®]	Composto de diferentes espécies de madeira	INS	1 mL/ 1 L
Calda Bordalesa	Sulfato de Cobre; Hidróxido de Cálcio	FUN	10g CuSO ₄ + 10g de Ca(OH) ₂ / 1L

INS= inseticida; FUN= fungicida

3.4.1 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre a Viabilidade de Esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Pesou-se 1 mg do produto comercial Thuricide[®] e acrescentando-se 10 mL de água destilada esterilizada obtivemos uma suspensão na concentração de $2,3 \times 10^{19}$, a partir dessa suspensão, foram realizadas diluições sucessivas em água destilada esterilizada e, preparada uma suspensão na concentração de $2,3 \times 10^5$ esporos/mL em frascos Erlenmeyer com 50 mL de água destilada esterilizada. Com o auxílio de um micropipetador automático, alíquotas de 300 μ L dessa suspensão foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de cada PFN na concentração recomendada.

Para cada produto comercial avaliado foram preparados quatro frascos Erlenmeyer, sendo cada um considerado uma repetição. Os frascos foram incubados em agitador horizontal (30 ± 2 °C, 150 rpm por 2 h). Previamente à incubação e ao término desta, foi mensurado o pH. A partir de cada frasco, com o auxílio de um micropipetador automático, a mistura foi inoculada em duas placas de Petri em cinco pontos de 5 μ L/ponto na superfície do meio de cultura ágar nutriente (AN) (ALVES; MORAES, 1998). As placas permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos para evaporação do excesso de água e, em seguida, foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de 30 ± 2

°C, por 18 h, sendo posteriormente quantificadas as Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL por ponto. Como testemunha do experimento, a suspensão de esporos foi adicionada e incubada apenas em água destilada esterilizada e posteriormente inoculada no meio de cultura conforme descrito.

3.4.2 Determinação da concentração de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* para utilização nos bioensaios

A partir do produto comercial Thuricide[®], na concentração recomendada para o controle de *A. gemmatalis* (300 g/ha/100 L H₂O), foram preparadas sete suspensões nas concentrações 250, 225, 200, 175, 150, 125 e 100 g/ha/100 L H₂O. Foi preparada a dieta artificial para *A. gemmatalis* (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976 modificada por HOFFMANN-CAMPO; OLIVEIRA, MOSCARDI, 1985), após a solidificação foram cortados cubos de aproximadamente 1,5 cm de lado. Para cada tratamento (concentração) foram preparadas quatro placas de Petri (repetições), com três cubos de dieta, cada. Em cada cubo de dieta, com auxílio de um micropipetador automático, foram adicionados 150 µL das suspensões. A testemunha constou da aplicação de água destilada esterilizada.

Após a aplicação das concentrações as placas permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos, para a evaporação do excesso de água e, receberam 25 lagartas de segundo ínstar de *A. gemmatalis* cada. As placas foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada (27 ± 2 °C, UR: 70 ± 10% e fotofase de 14 h). As avaliações foram realizadas após 24, 48 e 72 h, quantificando-se o número de lagartas mortas. A confirmação da mortalidade das lagartas por *B. thuringiensis* foi feita observando-se os sinais e sintomas, conforme Habib; Andrade (1998).

3.4.3 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre *A. gemmatalis* e Sobre Cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* *in vivo*

Para a realização do bioensaio, um volume de 50 mL dos produtos, nas concentrações recomendadas foram colocados, separadamente, em frascos Erlenmeyer. Foram

preparados frascos Erlenmeyers (tratamentos) contendo os produtos comerciais, a mistura da concentração predeterminada de Btk e os produtos, e da mistura de água destilada esterilizada e Btk. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições (frascos), os quais foram incubados em agitador horizontal (30 ± 2 °C, 150 rpm por 2 h). Previamente à incubação e ao término desta, foi mensurado o pH. A testemunha constou de frascos com 50 mL de água destilada esterilizada.

O conteúdo dos frascos Erlenmeyers foi aplicado em cubos de dieta artificial para *A. gemmatalis* como descrito anteriormente no item 3.4.2. Após a secagem, cada placa recebeu 20 lagartas de segundo ínstar de *A. gemmatalis* e, acondicionadas em câmara climatizada (27 ± 2 °C, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase 14 h). Após 72 h da instalação do bioensaio as lagartas sobreviventes foram transferidas das placas de Petri para recipientes plásticos (100 mL) contendo dieta artificial para *A. gemmatalis*, sem adição dos tratamentos. Foram distribuídas quatro lagartas por recipiente, sendo acondicionadas em câmara climatizada nas mesmas condições descritas anteriormente. As avaliações de mortalidade foram realizadas nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 h, quantificando-se o número de lagartas mortas que foram retiradas. A confirmação da mortalidade por *B. thuringiensis* foi feita observando-se os sinais e sintomas, conforme Habib; Andrade (1998).

Após 120 h as lagartas sobreviventes foram avaliadas diariamente observando-se a formação de pupas e a emergência. As pupas formadas foram retiradas dos recipientes plásticos e acondicionadas em tubos de vidro esterilizados (10 cm x 2,5 cm), retornando à câmara climatizada e mantidas por 480 h para avaliação da emergência e cálculo do período ovo-adulto.

Com relação aos dados dos parâmetros percentual de empupamento e percentual de emergência, avaliados para as lagartas sobreviventes, foram utilizadas duas bases de cálculo diferenciadas, denominadas de percentagem real e relativa. Para o cálculo da porcentagem real de empupamento considerou-se o total inicial de lagartas da repetição, enquanto que para a porcentagem relativa foi considerado o número de lagartas sobreviventes após 120 h da instalação do bioensaio. Da mesma forma, para os cálculos de emergência, a porcentagem real utiliza o total inicial de lagartas da repetição e para o percentual relativo, o número de pupas formadas em cada repetição.

Em ambos os experimentos (3.4.1 e 3.4.2), quando necessário, os dados foram transformados em Arcoseno ($\text{Asen}(\text{Raiz}(x/100))$) e submetidos à análise de variância (teste F), sendo as médias comparadas com as respectivas testemunhas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Bioestat 5.0[®] (AYRES et al., 2007).

3.4.4 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre Operárias Adultas de *A. mellifera*

3.4.4.1 Pulverização dos produtos fitossanitários naturais comerciais

Operárias de *A. mellifera*, recém emergidas, foram acondicionadas em recipientes plásticos, anestesiadas com CO₂ e transferidas para placas de Petri em grupos de 10 indivíduos. Em seguida, cada placa foi pulverizada com 1 mL dos produtos, utilizando-se um aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão constante 1,2 kgf/cm. Cada tratamento constou de 30 operárias pulverizadas, as quais foram transferidas, individualmente, para tubos de vidro esterilizados (10 cm × 2,5 cm), sendo cada tubo considerado uma repetição, totalizando 30 repetições por tratamento. Os tubos foram vedados com tecido *voil*, e sobre este foi fornecido alimento constituído de pasta Cândi (açúcar de confeitiro e mel) e um pedaço de algodão embebido em água destilada. A testemunha constou da pulverização de água destilada esterilizada.

Os tubos foram mantidos em câmara climatizada (25 ± 2 °C, U.R. 70 ± 10%, fotofase de 12 h). A mortalidade das operárias foi avaliada a uma; duas; três; quatro; cinco; seis; nove; 12; 15; 18; 21; 24; 30; 36; 42; 48; 60; 72 e 96 h após a pulverização dos extratos (BAPTISTA et al., 2009).

Os dados foram transformados em logaritmo e submetidos à análise de sobrevivência e a médias comparadas pelo teste de Duncan, com auxílio do programa estatístico Assistat (SILVA, 2012).

3.4.4.2 Adição dos produtos fitossanitários naturais comerciais em pasta Cândi

Operárias de *A. mellifera*, recém emergidas, foram transferidas para tubos de vidro esterilizados (repetições), conforme descrito no item 3.4.3.1. Os tubos foram vedados com tecido *voil*, e sobre este foi fornecido alimento que foi composto de pasta Cândi acrescida dos produtos na concentração recomendada (tratamentos) e um pedaço de algodão embebido em água destilada esterilizada. Foram preparadas duas testemunhas, sendo a

primeira composta por pasta Cândi acrescida de água destilada esterilizada e a segunda composta de pasta Cândi pura. As condições experimentais, os parâmetros avaliados e a análise dos dados foram os mesmos descritos no item 3.4.4.1.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais sobre a Viabilidade de Esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Verificou-se que os produtos Natuneem[®] e Rotenat[®] provocaram um aumento significativo no número de UFC/mL, com médias de 140,00% e 123,20% respectivamente, comparando-se a testemunha. Os demais produtos não diferiram da testemunha (Tabela 8).

Tabela 8 - Número médio (\pm EP) de UFC/mL de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada, inoculação em meio de cultura ágar nutriente, em placas de Petri e incubação em câmara climatizada (30 ± 2 °C, 18 h) e, pH inicial e final. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Média UFC/mL ($\times 10^5$)	UFC Rel. Test (%) ¹	pH	
			0h	2h
Testemunha	2,50 \pm 0,80 bc		5,33	5,99
Naturalho [®]	4,58 \pm 0,55 ab	+ 83,20	7,38	6,38
Natuneem [®]	6,00 \pm 0,46 a	+ 140,00	6,04	6,97
Pironat [®]	2,28 \pm 0,35 bc	- 8,80	3,95	4,26
Rotenat [®]	5,58 \pm 0,46 a	+ 123,20	6,16	8,40
Calda Bordalesa	1,35 \pm 0,40 c	-46,00	12,03	12,01
P	0,0001			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem, significativamente, entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).¹ Fórmula:

$\frac{\text{Média UFC/ml Trat}}{\text{Média UFC/ml Test}} \times 100 - 100$, sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução em relação à testemunha.

Natuneem[®] é um produto composto a base de óleo de nim, revigorante orgânico, óleo de mamona e extratos vegetais bioativos (NATURAL RURAL, 2011a). O efeito observado para o produto Natuneem[®] possivelmente esteja relacionado a esses compostos.

Em estudo sobre a ação antibacteriana de solução derivada do óleo de mamona (Endoquil – detergente derivado de óleo de mamona), observou-se atividade antibacteriana a bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), entretanto não houve efeito sobre bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (LEONARDO et al., 2001).

A atividade antibacteriana da mamona possivelmente esteja relacionada a presença de alcaloides cujo modo de ação é baseado na sua habilidade de intercalar o DNA e impedir sua síntese através da inibição de enzimas como a topoisomerase II (BONJEAN et al., 1998; COWAN, 1999). De acordo com Lima; Moreira; Pinto (2011) a mamona apresenta entre seus componentes a ricina, um alcaloide extremamente tóxico.

De acordo com Baswa et al. (2001), o óleo de nim apresenta atividade antibacteriana relacionada a inibição da síntese da membrana celular bacteriana. A atividade antibacteriana de extratos de folhas de nim foi testada sobre bactérias Gram-positivas (*Micrococcus glutamicus*, *Lactobacillus bulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*E. coli* and *Pseudomonas denitrificans*), o extrato diclorometano de folhas de *A. indica* foi o mais ativo contra as bactérias avaliadas, apresentando zonas de inibição em milímetros de respectivamente, 18, 15, 15, 16, 16, 15, 15, 16, 15 mm (RAJASEKARA et al., 2008).

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Silva (2010) em avaliação de um produto a base de nim (Natural neem) sobre esporos de Btk observou redução significativa (33,10%) na formação de UFC/mL. Da mesma forma, Silva et al. (2012) observaram que o produto Dalneem reduziu 100,00% a formação de UFC/mL na concentração recomendada.

Essa divergência de resultados possivelmente está relacionada a concentração dos produtos utilizados. De acordo com Morandi Filho et al. (2006), para os produtos a base de nim comercializados no Brasil não existe uma garantia quanto a padronização da concentração do ingrediente ativo, o que pode ter causado essa diferença de resultados para os diferentes produtos comerciais a base de nim. Ainda a concentração utilizada para o produto

Natuneem[®] (50 mL/100L) foi menor do que a concentração utilizada por Silva (2010) para o produto Natural neem (500ml/100L) e por Silva et al. (2012) para o produto Dalneem (1L/100L).

Além disso, mesmo sendo o óleo de nim o composto principal, outros ingredientes diferem entre esses produtos, o que pode ter provocado essa variação de efeitos sobre a formação das UFC/ml.

O produto Rotenat CE[®] é um composto a base de extrato de timbó, *Derris* sp. (Fabaceae) e ácidos graxos, sendo seu princípio ativo a rotenona encontrada na concentração de 5% no produto (NATURAL RURAL, 2011b). A rotenona é um alcaloide, conforme mencionado anteriormente os alcaloides podem agir sobre bactérias intercalando o DNA e impedindo sua síntese através da inibição de enzimas como a topoisomerase II (BONJEAN et al. 1998; COWAN, 1999). Entretanto, os resultados observados neste estudo são semelhantes aos observados por Dougherty; Reichelderfer; Faust (1971) em estudo com rotenona obtida com os solventes etanol e DMSO (Dimetilsulfóxido). De acordo com os autores, para ambos os solventes a rotenona não apresentou inibição do crescimento bacteriano de *B. thuringiensis* subesp. *thuringiensis*, contudo os autores não relatam efeito de estímulo ao crescimento bacteriano.

Embora o aumento de UFC/mL (83,20%) provocado pelo produto Natualho[®] não tenha diferido significativamente da testemunha representa um valor percentual expressivo. Natualho[®] é um produto proveniente do extrato de alho, *A. sativum* L. (Liliaceae) obtido através de extração a frio e solvente natural, o que lhe garante total solubilidade em água (NATURAL RURAL, 2011c).

Em estudo sobre a atividade antibacteriana do extrato aquoso de bulbos de alho sobre as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e as Gram-negativas *E. coli* e *Klebsiella pneumonia* foi observado a concentração inibitória mínima de 100µg/mL para todas as bactérias e os halos de inibição observados foram, respectivamente, de 20, 14, 16, 17 mm (MERIGA; MOPURI; MURALIKRISHNA, 2011). De acordo com os autores a atividade antibacteriana do extrato de alho está relacionada a presença do composto alicina, esse constituinte importante do extrato de alho interfere na produção do RNA, bem como na síntese de lipídios afetando severamente as células bacterianas. Possivelmente a ausência de efeito negativo sobre a formação de UFC/mL de Btk observada no presente estudo se deva a resistência dos esporos da bactéria.

Embora não tenha sido significativo para o produto Natualho[®], o aumento na formação de UFC/mL observado para os produtos Natuneem[®], Rotenat[®] e Natualho[®],

possivelmente deva-se a presença de compostos nesses produtos que estimularam a germinação dos esporos, sem, porém afetar as células bacterianas. De acordo com Setlow (2003), a germinação de esporos de espécies de *Bacillus* está relacionada a presença de nutrientes como aminoácidos, açúcares e nucleosídios que se ligam a receptores específicos desencadeando o processo de germinação, podendo ocorrer também na presença de outros agentes como altas pressões, sais e íons Ca^{+2} .

A Calda Bordalesa embora não tenha diferido significativamente da testemunha apresentou, percentualmente, valor expressivo de inibição na formação das UFC/mL (46,00%). A Calda Bordalesa é obtida na mistura de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e cal virgem (CaO), que reagindo com água, forma hidróxido de cobre II ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), proporcionando um meio alcalino (FELIX, 2005).

Ao contrário dos demais produtos avaliados, a Calda Bordalesa apresentou pH com valores próximos a 12. Contudo o pH parece não ter influenciado no resultado observado uma vez que o pH alcalino é o principal ativador do processo de germinação de esporos de Bt (WILSON; BENOIT, 1993), o que indica que, possivelmente, o sulfato de cobre e a cal, estejam relacionados a redução na formação UFC/mL.

Hassen et al. (1998) avaliaram a tolerância de Bt ao sulfato de cobre em seis concentrações e verificaram que a concentração de 250 mM (milli-Mols) inibiu quase que completamente o crescimento da bactéria. Em estudo da tolerância de bactérias Gram-positivas aos metais pesados cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) verificou-se que entre os três metais, *B. thuringiensis* foi mais sensível ao cobre, sendo que as concentrações dos respectivos metais, que causaram 50% de redução do crescimento foram 1,53 mg/L, 0,82 mg/L e 2,98 mg/L (RATHNAYAKE et al., 2010).

Ainda em estudo com diferentes concentrações de produtos alternativos sobre esporos de Btk a Calda Bordalesa provocou redução significativa da formação de UFC/mL em 100% na concentração recomendada (SILVA et al., 2012).

3.5.2 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais Sobre *A. gemmatilis* e Sobre Cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* *in vivo*.

No bioensaio para a determinação da quantidade de Btk a ser utilizada para avaliar a atividade dos produtos comerciais sobre os cristais da bactéria, selecionou-se a

concentração de 0,50 g de Btk/ha/100 L/H₂O. Tal valor equivale a metade da menor concentração utilizada, uma vez que a menor concentração utilizada causou mortalidade de 100%.

No bioensaio com os produtos comerciais e Btk, verificou-se que a mortalidade acumulada de *A. gemmatilis* para cada produto, isoladamente, não diferiu significativamente da testemunha, indicando a ausência de atividade sobre a sobrevivência larval no período avaliado (Tabela 9). Entretanto, quando os produtos foram avaliados em mistura com Btk, verificou-se que somente a Calda Bordalesa afetou negativamente a atividade tóxica dos cristais, com redução significativa da mortalidade acumulada (2,50%), comparando-se com Btk (98,68%).

Para os demais produtos (Natuneem[®], Rotenat[®], Natualho[®], Pironat[®]) não houve efeito negativo sobre a atividade tóxica dos cristais, sendo que a mortalidade acumulada foi respectivamente, de 100,00%, 100,00%, 94,66% e 100,00%, não diferindo significativamente do Btk (98,68%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Porcentagem média (\pm EP) da mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *Anticarsia gemmatalis* causada por produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada isoladamente e, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* em diferentes tempos e mortalidade acumulada, após incubação (30 ± 2 °C, 150 rpm, 2 h) e pH inicial e final. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamentos	Tempo h					Mortalidade Acumulada	p	pH	
	24	48	72	96	120			0h	2h
Testemunha	2,50 \pm 2,50 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	3,75 \pm 2,39 b	0,5660	6,84	8,84
Rotenat[®]	1,25 \pm 1,25 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 b	0,4392	6,01	8,19
Btk¹	26,91 \pm 9,69 Ba	65,26 \pm 8,42 Aa	6,51 \pm 1,34 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	98,68 \pm 1,31 a	0,0001	6,51	7,43
Rotenat[®] +Btk	33,51 \pm 8,57 Aa	61,73 \pm 5,93 Aa	4,76 \pm 4,73 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	100,00 \pm 0,00 a	0,0001	6,06	7,04
p	0,0011	0,0001	0,0266	0,8333	0,4277	0,0001			
Testemunha	2,50 \pm 2,50 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	3,75 \pm 2,39 b	0,5660	6,84	8,84
Pironat[®]	0,00 \pm 0,00 Abc	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	1,25 \pm 1,25 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	2,50 \pm 1,44 b	0,5750	4,11	5,13
Btk	26,91 \pm 9,69 Bba	65,26 \pm 8,42 Aa	6,51 \pm 1,34 Cab	0,00 \pm 0,00 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	98,68 \pm 1,31 a	0,0001	6,51	7,43
Pironat[®] +Btk	34,47 \pm 15,67 Aa	63,03 \pm 14,24 Aa	2,50 \pm 2,50 Bb	0,00 \pm 0,00 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	100,00 \pm 0,00 a	0,0002	4,29	4,57
p	0,0057	0,0001	0,0036	0,4277	0,5912	0,0001			
Testemunha	2,50 \pm 2,50 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	3,75 \pm 2,39 b	0,5660	6,84	8,84
Naturalho[®]	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 Aa	0,00 \pm 0,00 b	0,8332	6,16	7,87
Btk	26,91 \pm 9,69 Ba	65,26 \pm 8,42 Aa	6,51 \pm 1,34 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	98,68 \pm 1,31 a	0,0001	6,51	7,43
Naturalho[®] +Btk	30,90 \pm 19,46 ABa	51,10 \pm 12,62 Aa	11,45 \pm 7,22 ABa	1,25 \pm 1,25 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	94,66 \pm 2,27 a	0,0097	6,15	6,82
p	0,0430	0,0001	0,0400	0,4277	0,4277	0,0001			
Test Água	2,50 \pm 2,50 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	3,75 \pm 2,39 b	0,5660	6,84	8,84
Natuneem[®]	1,32 \pm 1,31 Aa	0,00 \pm 0,00 Ab	1,25 \pm 1,25 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	6,25 \pm 6,25 Aa	8,82 \pm 5,53 b	0,6608	6,68	8,02
Btk	26,91 \pm 9,69 Ba	65,26 \pm 8,42 Aa	6,51 \pm 1,34 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	98,68 \pm 1,31 a	0,0001	6,51	7,43
Natuneem[®] +Btk	20,00 \pm 13,54 Ba	78,75 \pm 14,77 Aa	1,25 \pm 1,25 Bb	0,00 \pm 0,00 Ba	0,00 \pm 0,00 Ba	100,00 \pm 0,00 a	0,0001	6,45	8,1
p	0,0373	0,0001	0,0055	0,8333	0,5412	0,0001			
Testemunha	2,50 \pm 2,50 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	3,75 \pm 2,39 b	0,5660	6,84	8,84
Cald. Bord.	7,35 \pm 7,35 Aab	1,47 \pm 1,47 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	1,47 \pm 1,47 Aa	1,47 \pm 1,47 Aa	11,76 \pm 11,76 b	0,8008	12,18	12,55
Btk	26,91 \pm 9,69 Ba	65,26 \pm 8,42 Aa	6,51 \pm 1,34 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	0,00 \pm 0,00 Ca	98,68 \pm 1,31 a	0,0001	6,51	7,43
Cald. Bord. +Btk	0,00 \pm 0,00 Ab	0,00 \pm 0,00 Ab	1,25 \pm 1,25 Ab	0,00 \pm 0,00 Aa	1,25 \pm 1,25 Aa	2,50 \pm 2,5 b	0,5750	12,25	12,51
p	0,0115	0,0001	0,0004	0,4277	0,8021	0,0001			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹ *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

O efeito negativo observado para a Calda Bordalesa sobre os cristais de Btk pode estar relacionado a sua composição que é resultado da mistura de sulfato de cobre pentahidratado e cal virgem, que reagindo com água forma hidróxido de cobre II, proporcionando um meio alcalino (FELIX, 2005).

Em avaliação de aditivos químicos com a finalidade de aumentar o espectro de ação do Btk contra a traça do arroz *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae), El-Moursy; Sharaby; Awad (1993) observaram que o sulfato de cobre, substância presente na Calda Bordalesa, misturado com cristais de Btk e adicionado na dieta artificial de *C. cephalonica* foi antagonico, reduzindo o efeito tóxico dos cristais de Btk.

A inibição da atividade tóxica dos cristais de Btk pela Calda Bordalesa também foi observada por Silva et al. (2012) em estudo semelhante. Segundo os autores, a Calda Bordalesa, no dobro da concentração recomendada, misturada com Btk causou mortalidade média total de 1,9%, não diferindo significativamente da testemunha (1,0%) e da Calda Bordalesa sem Btk (2,8%). Os autores relacionam a perda da capacidade do Btk de causar a morte das lagartas após a incubação com a Calda Bordalesa à possível dissolução do cristal no meio alcalino da calda (pH 12,41), semelhante ao observado neste estudo (12,44). Tal observação está de acordo com Habib; Andrade (1998) que afirmam que em pH acima de 8 pode ocorrer solubilização dos cristais de Bt. Nesse sentido, pode-se inferir que a alcalinidade da calda tenha solubilizado os cristais, impedindo a ativação após a ingestão pelo inseto e/ou desativado as proteínas do cristal.

Com relação ao produto Natuneem[®], em mistura com Btk, não se verificou atividade negativa sobre a toxicidade dos cristais, com mortalidade acumulada de 100,00%, sem diferença significativa para Btk (98,68%) (Tabela 9).

Em estudo sobre o efeito combinado de concentrações subletais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* e azadiractina, obtida a partir de extrato de sementes de nim, Singh; Rup e Koul (2007) observaram que além aumentar a mortalidade de larvas de *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) a combinação também reduziu o tempo necessário para a observação dessa mortalidade. De acordo com os autores o modo de ação dos dois inseticidas sugere uma interação complementar, de modo que a azadiractina, presente no extrato de nim, facilita o acesso das toxinas Bt aos receptores do intestino, acelerando a ligação da toxina aos receptores, resultando em um aumento de eficácia.

Resultado semelhante ao verificado no presente estudo foi observado para o produto Dalneem[®], também a base de nim, em mistura com Btk. Após 72 h de avaliação, a mortalidade total de lagartas de *A. gemmatilis* foi de 100,00%, não diferindo,

significativamente, do Btk (99,10%) (SILVA et al., 2012).

Os produtos Rotenat[®] (rotenona) e Pironat[®] (extrato pirolenhoso), em mistura com Btk, não apresentaram efeito negativo sobre os cristais. Em estudo sobre o efeito de produtos fitossanitários naturais comerciais sobre Btk foi verificado que o produto Pironim, que apresenta na sua composição rotenona e extrato pirolenhoso, além de nim e piretro natural, não provocou efeito negativo sobre a toxicidade do cristal de Btk, com mortalidade total de 96,2% não diferindo do Btk (99,1%) (SILVA et al. 2012).

A escassez de trabalhos específicos referentes a interação de *B. thuringiensis* com compostos observados nos produtos utilizados nesse estudo limita a discussão dos resultados aqui observados.

Com relação ao tempo de mortalidade, observa-se que para os produtos, isoladamente, não houve diferença significativa na mortalidade de *A. gemmatalis* entre os tempos. Por outro lado, na aplicação de Btk, isoladamente, verificou-se maior percentual de mortalidade no tempo de 48 horas, diferindo significativamente dos demais tempos (Tabela 9)

Por sua vez, na aplicação da mistura dos produtos comerciais e Btk, observou-se que para Rotenat[®], Pironat[®] e Natualho[®], os percentuais de mortalidade nos tempos de 24 horas e 48 horas não diferiram significativamente, evidenciando que a mistura acelerou a mortalidade (Tabela 9). Tal fato é vantajoso para o controle de *A. gemmatalis*, pois acelera a redução da população do inseto em um menor tempo, por debilitar o inseto e permitir ação mais rápida do patógeno. Já para a Calda Bordalesa não houve diferença significativa entre os tempos avaliados, com valores de mortalidade próximos de zero (Tabela 9).

Para a discussão dos resultados dos parâmetros percentual de empupamento e percentual de emergência, avaliados para as lagartas sobreviventes, os dados receberam duas bases de cálculos diferenciadas, denominadas de porcentagem real e relativa. Isto foi necessário devido aos elevados percentuais de mortalidade observados nos tratamentos com Btk e, conseqüentemente, o reduzido número de pupas formadas nesses tratamentos.

Com relação ao percentual real de empupamento, isoladamente para os produtos Natualho[®] (18,75%) e Calda Bordalesa (6,25%) observou-se redução significativa para este parâmetro, comparado a testemunha (52,50%). Por outro lado, não se observou efeito negativo para os produtos Natuneem[®] (30,26%), Rotenat[®] (47,50%) e Pironat[®] (47,50%) aplicados isoladamente, uma vez que não diferiram significativamente da testemunha. De maneira geral, o mesmo padrão de resultados pode ser observado para esses tratamentos na análise relativa dos dados (Tabela 10).

Tabela 10 - Porcentagem média (\pm EP) de empupamento e emergência real e relativa e período ovo-adulto de *Anticarsia gemmatalis* tratada com produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Ti ¹	% vivos ²	% mortos ³	Total real de empupamento (%) ⁴	Total real de emergência (%) ⁴	Total relativo de empupamento (%) ⁵	Total relativo de emergência (%) ⁶	Período Ovo-Adulto (dias) ⁷
Testemunha	20	96,2	3,80	52,50 \pm 4,33 a	8,75 \pm 2,39 a	56,00	17,76	23,02
Rotenat [®]	20	98,70	1,30	47,50 \pm 14,36 a	7,50 \pm 3,23a	48,16	12,19	23,08
Btk ⁸	20	1,32	98,68	1,32 \pm 1,32 b	1,32 \pm 1,31ab	25,00	25,00	30,00
Rotenat [®] +Btk	20	0,00	100,00	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00b	0,00	0,00	0,00
p				0,0001	0,0086			
Testemunha	20	96,2	3,80	52,50 \pm 4,33 a	8,75 \pm 2,39 a	56,00	17,76	23,02
Pironat [®]	20	97,50	2,50	47,50 \pm 14,79 a	5,00 \pm 2,89 ab	48,82	6,90	23,00
Btk	20	1,32	98,68	1,32 \pm 1,32 b	1,32 \pm 1,31 ab	25,00	25,00	30,00
Pironat [®] +Btk	20	0,00	100,00	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b	0,00	0,00	0,00
p				0,0001	0,0199			
Testemunha	20	96,2	3,80	52,50 \pm 4,33 a	8,75 \pm 2,39 a	56,00	17,76	23,02
Natualho [®]	20	100,00	0,00	18,75 \pm 12,48 b	2,50 \pm 2,50 ab	18,75	4,55	23,00
Btk	20	1,32	98,68	1,32 \pm 1,32 b	1,32 \pm 1,31b	25,00	25,00	30,00
Natualho [®] +Btk	20	5,34	94,66	3,95 \pm 1,32 b	0,00 \pm 0,00 b	62,50	0,00	0,00
p				0,0004	0,0120			
Testemunha	20	96,2	3,80	52,50 \pm 4,33 a	8,75 \pm 2,39a	56,00	17,76	23,02
Natuneem [®]	20	91,18	8,82	30,26 \pm 12,68 a	1,25 \pm 1,25 b	31,37	1,92	22,00
Btk	20	1,32	98,68	1,36 \pm 1,32 b	1,32 \pm 1,31 b	25,00	25,00	30,00
Natuneem [®] +Btk	20	0,00	100,00	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 1,25 b	0,00	0,00	0,00
p				0,0001	0,0034			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ¹ - Total inicial - número de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* utilizadas em cada repetição de todos os tratamentos; ² - Porcentagem de lagartas vivas após 120 h de avaliação; ³ - Porcentagem de lagartas mortas após 120 h de avaliação; ⁴ Percentual referente ao total inicial de lagartas de cada tratamento; ⁵ Percentual referente ao total de lagartas vivas após 120 h de avaliação; ⁶ Percentual referente ao total de pupas formadas em cada tratamento; ⁷ - Não foi possível realizar a análise estatística devido a insuficiência dos dados; ⁸ - *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Continuação Tabela 10- Porcentagem média (\pm EP) de empupamento e emergência real e relativa e período ovo-adulto de *Anticarsia gemmatalis* tratada com produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada, misturados com *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*. Temperatura 26 ± 2 °C, 12 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Ti ¹	% vivos ²	% mortos ³	Total real de empupamento (%) ⁴	Total real de emergência (%) ⁴	Total relativo de empupamento (%) ⁵	Total relativo de emergência (%) ⁶	Período Ovo-Adulto (dias) ⁷
Testemunha	20	96,2	3,80	52,50 \pm 4,33 a	8,75 \pm 2,39a	56,00	17,76	23,02
Cald. Bord.	20	88,24	11,76	6,25 \pm 3,14 b	1,25 \pm 1,25 b	4,69	8,33	22,00
Btk	20	1,32	98,68	1,32 \pm 1,32 b	1,32 \pm 1,31 b	25,00	25,00	30,00
Cald. Bord. +Btk	20	97,50	2,50	4,19 \pm 2,79 b	0,00 \pm 0,00 b	6,25	0,00	0,00
P				0,0001	0,0034			

Dados transformados em Arcoseno (Arcoseno (Raiz (x/100))). Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ¹ - Total inicial - número de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* utilizadas em cada repetição de todos os tratamentos; ² - Porcentagem de lagartas vivas após 120 h de avaliação; ³ - Porcentagem de lagartas mortas após 120 h de avaliação; ⁴ Percentual referente ao total inicial de lagartas de cada tratamento; ⁵ Percentual referente ao total de lagartas vivas após 120 h de avaliação; ⁶ Percentual referente ao total de pupas formadas em cada tratamento; ⁷ - Não foi possível realizar a análise estatística devido a insuficiência dos dados; ⁸ - Testemunha; ⁹ - *Bacillusthuringiesnsi* subesp. *kurstaki*

O efeito da Calda Bordalesa sobre a formação de pupas observado neste trabalho possivelmente se deva, principalmente, a adição de cobre na dieta artificial de *A. gemmatalis*, conforme descrito anteriormente, o sulfato de cobre é um dos componentes desta calda.

De acordo com Sivapalan e Gnanapragasam (1980) a adição de cobre na dieta de *Homona coffearia* (Lepidoptera: Tortricidae) afetou negativamente, de forma significativa o crescimento e desenvolvimento do inseto. Segundo os autores a partir de 200 ppm as larvas formaram pupas mas não houve emergência, quando a concentração foi aumentada para 250 ppm as larvas foram capazes de crescer apenas até o terceiro ínstar e concentrações acima de 500 ppm provocaram mortalidade total 24 h após a inoculação.

Já produto Natualho[®] possui como principal componente, extrato de alho. Com referência a este extrato, o efeito inseticida foi observado sobre larvas de *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). Os extratos aquosos e metanólico causaram mortalidade de 64% e 81%, respectivamente, quando avaliados na concentração de 1000 ppm (MERIGA; MOPURI; MURALIKHISHNA, 2011). De acordo com os autores, o efeito inseticida dos extratos aquoso e metanólico de alho possivelmente estejam relacionados aos metabólitos secundários presentes, sendo as saponinas e os taninos para o extrato aquoso e saponinas e alcaloides para o extrato metanólico.

O efeito dos taninos sobre os insetos está relacionado à sua capacidade de ligar-se a proteínas no intestino e inibir sua digestão, além de outros mecanismos de ação como inibição da alimentação, redução na eficiência de utilização dos nutrientes e formação de lesões na camada epidérmica do intestino médio (BARBEHENN; MARTIN, 1994). Entre os terpenoides, as saponinas representam o principal grupo, sendo tóxicas e deterrentes para herbívoros em geral (CAVALCANTE; MOREIRA; VASCONCELOS, 2006). Nesse sentido, infere-se que a ação desses componentes tenha ocasionado os efeitos observados para *A. gemmatalis* neste estudo.

Embora os produtos Natuneem[®], Rotenat[®], Pironat[®] aplicados isoladamente, não tenham apresentado efeito negativo sobre o percentual de empupamento das lagartas de *A. gemmatalis*, resultados diferentes já foram demonstrados para outros insetos pragas, principalmente lepidópteros.

O nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), principal componente do Natuneem[®], possui substâncias inseticidas dentre elas a azadiractina, um terpenoide amplamente estudado que apresenta, dentre os compostos do nim, a maior atividade tóxica contra insetos (MARTINEZ, 2008). Em estudo do efeito de extratos aquosos de folhas de

cinamomo, *Melia azedarach* L. (Meliaceae) e de sementes de nim, *A. indica*, na concentração de 5% sobre de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), verificou-se que ambos reduziram a formação de pupas. Para o extrato de *A. indica*, apenas 34,3% das lagartas atingiram a fase de pupa, valor significativamente inferior ao observado com o extrato de *M. azedarach* (56,2%) e na testemunha (80%) (BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010).

O efeito de Natuneem[®] e Neenseto[®] também foram avaliados sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório e foi observado que os produtos na concentração de 10 mL/L (0,01%) causaram mortalidade de 62,9% e 82,9% respectivamente, além de ambos provocarem alongamento da fase larval (LIMA et al., 2010).

Os efeitos dos produtos a base de nim são bastante variáveis entre as diferentes espécies de insetos (MARTINEZ, 2008). Além disso, essa divergência de resultados possivelmente deva-se a variações nas concentrações utilizadas, sendo a concentração do produto Natuneem[®] avaliado no presente estudo menor que as citadas nos trabalhos acima.

Em estudo da eficácia de produtos de origem vegetal sobre *Plutella xilostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), foi observado que o extrato pirolenhoso, principal componente do Pironat[®], na concentração de 5%, ocasionou mortalidade significativa de 73,3% em comparação com a testemunha (16,7%) e, na concentração de 10% causou mortalidade total das lagartas (THULER; DE BORTOLI; BARBOSA, 2007).

Para o percentual real de empupamento nenhuma das misturas de produtos com Btk diferiu significativamente do Btk. No entanto, com relação ao empupamento relativo para os produtos com Btk, observa-se que para o produto Natualho[®], 62,50% dos indivíduos sobreviventes atingiram a fase de pupa, enquanto que para Btk o percentual foi de 25% (Tabela 10).

Com relação a Calda Bordalesa com Btk, no percentual relativo de empupamento observou-se que de 97,50% das lagartas sobreviventes, apenas 6,25% chegaram ao estágio de pupa, indicando que possivelmente os constituintes da calda tenham afetado a sobrevivência das lagartas, conforme descrito acima, impedindo que elas alcançassem a fase de pupa (Tabela 10).

No que se refere ao total real de emergência para os produtos Natuneem[®] (1,25%) e Calda Bordalesa (1,25%) o percentual de emergência foi significativamente menor, comparando-se a testemunha (8,75%). Enquanto os produtos Rotenat[®] (7,50%), Pironat[®] (5,00%) e Natualho[®] (2,50%) não diferiram significativamente da testemunha (8,75%). (Tabela 10).

O óleo de nim composto base do produto Natuneem[®], é mundialmente conhecido por seu efeito no controle de insetos (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Efeito de mortalidade na fase larval já foi descrito para extratos de nim sobre espécies de lepidópteros (GONÇALVEZ-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2007; BRUNHEROTTO; VENDRAMIM; ORIANI, 2010), contudo no presente estudo não se observou efeito do Natuneem[®] sobre a mortalidade de larvas de *A. gemmatalis*.

Entre os parâmetros avaliados o produto Natuneem[®] apresentou efeito apenas sobre a emergência de *A. gemmatalis*. Esse efeito pode estar relacionado a uma possível redução da sobrevivência das pupas. De acordo com Martinez (2008), a azadiractina, principal composto inseticida do nim, por sua semelhança com o hormônio da ecdise, afeta essa transformação, provocando mortalidade na fase larval e também na fase pupal. A redução significativa da sobrevivência das pupas também foi constatada por Brunherotto; Vendramim; Oriani (2010) utilizando extrato aquoso de *A. indica* a 0,1% sobre *T. absoluta*.

Na mistura com Btk nenhum dos produtos diferiu do Btk, isoladamente, em relação ao total real de emergência. Porém, quando se observa o total relativo de emergência para os tratamentos com Btk, nota-se que todos os indivíduos que formaram pupas no Btk (25,0%), emergiram, enquanto que para o tratamento Natualho[®] com Btk não houve indivíduos emergidos.

Em estudo referente ao efeito de *B. thuringiensis* subesp *aizawai* (Bta) pulverizado sobre folhas de milho e oferecido a lagartas de *S. frugiperda* com 10 dias de idade também não foi observado efeito sobre a viabilidade pupal, que variou de 77,5% a 70,0% respectivamente nas concentrações de 5g/L e 10g/L, não diferindo significativamente da testemunha (95,0%) (LIMA et al., 2010).

O reduzido número de indivíduos emergidos nos tratamentos contendo Btk impossibilitou a realização da análise estatística para o parâmetro período ovo-adulto. No entanto, as larvas que se alimentaram de dietas contendo Btk, isoladamente, tiveram alongamento desse período (30 dias), em relação a testemunha (23,02 dias) e aos produtos Rotenat[®] (23,08 dias), Pironat[®] (23 dias), Natualho[®] (23 dias), Natuneem[®] (22 dias) e Calda Bordalesa (22 dias) (Tabela 10).

Dois efeitos fundamentais para um agente de controle são o alongamento do período ovo-adulto e a mortalidade na fase larval, de modo conjunto estes efeitos podem aumentar o tempo de exposição da praga aos inimigos naturais, reduzir o crescimento populacional e as populações subsequentes através do aumento do tempo médio de cada geração da praga (TORRES; BARROS; OLIVEIRA, 2001).

O alongamento do período ovo-adulto pode representar um efeito subletal de Btk. Segundo Polaczyk (2004), além da patogenicidade e virulência de *B. thuringiensis* aos insetos, outros aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, embora difíceis de detectar, certamente ocorrem e representam um importante parâmetro que auxilia na avaliação de sua atividade tóxica.

No presente estudo observou-se efeito positivo da associação entre os produtos fitossanitários naturais comerciais e a atividade tóxica dos cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*. De acordo com Gill (1995) as toxinas do Btk podem afetar a habilidade do intestino dos insetos em detoxificar os produtos do metabolismo secundários das plantas encontrados nos produtos fitossanitários naturais, provocando assim um aumento na sensibilidade dos insetos a esses produtos. Assim a associação positiva observada nesse estudo possivelmente se deva a isso.

A possibilidade de associação positiva entre produtos fitossanitários naturais e *B. thuringiensis* pode ser útil para controlar populações de insetos praga com resistência ao Bt, reduzindo a concentração da endotoxina numa mistura se reduz a pressão de seleção ao Bt. Esse tipo de estratégia é importante para programas de manejo integrado de pragas e para a gestão do manejo de resistência ao Bt (SINGH; RUP; KOUL, 2007).

3.5.3 Atividade dos Produtos Fitossanitários Naturais Comerciais sobre Operárias Adultas de *A. mellifera*

3.5.3.1 Pulverização dos produtos fitossanitários naturais comerciais e *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Nenhum dos produtos avaliados apresentou atividade sobre a longevidade de *A. mellifera*, comparando-se a testemunha (Tabela 11). Embora não tenha apresentado efeito significativo, observou-se variação de longevidade de 62,00 h (Pironat[®]) a 92,00 h (Rotenat[®]) (Tabela 11).

Tabela 11 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após pulverização de produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada. Temperatura 30 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, 2012.

Tratamento	Longevidade
Testemunha	77,80 \pm 7,17 ab
Btk ¹	66,67 \pm 7,00 b
Rotenat [®]	92,00 \pm 5,67 a
Pironat [®]	62,00 \pm 5,19 b
Natuneem [®]	82,10 \pm 6,16 ab
Naturalho [®]	78,23 \pm 7,23 ab
Calda Bordalesa	69,00 \pm 5,93 ab
CV %	15,46

Dados transformados em logaritmo. Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). ¹*Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Em avaliação da bioatividade de Btk (produto Dipel[®] PM), sobre adultos de *A. mellifera*, observou-se que a concentração de 2,5g/100 mL (concentração que mais se assemelha a utilizada nesse estudo) provocou mortalidade significativa de 57,0% após 96 horas da pulverização com e longevidade média de 60,00 horas, valor próximo ao observado nesse estudo (BRIGHENTI et al., 2007).

O produto Natuneem[®] provocou um aumento na longevidade (82,10 horas) das operárias de *A. mellifera*, contudo sem diferir significativamente da testemunha (77,80 horas), de modo que esse produto parece não ter apresentado efeito tóxico sobre as abelhas. Contudo em estudo semelhante verificou-se que o produto Natuneem[®] foi tóxico a operárias de *A. mellifera*, causando cerca de 85,0% de mortalidade após seis dias de exposição por contato (XAVIER, 2009).

Para os produtos Rotenat[®] e Naturalho[®] observaram-se longevidades de 92,00 h e 78,23 h, respectivamente, contudo nenhum deles diferiu significativamente da testemunha (77,80 h). Para esses produtos Xavier (2009) observou mortalidade de cerca de 35% e 60% após seis dias de exposição, respectivamente, havendo de acordo com o autor a presença de efeito tóxico sobre *A. mellifera*.

Essa divergência de resultados possivelmente deva-se a variações na metodologia, Xavier (2009) expôs as abelhas por contato com folhas de abóbora que foram imersas nos produtos, as abelhas foram mantidas em contato com as folhas durante 6 dias.

Quando o óleo de neem foi pulverizado sobre abelhas adultas de *A. mellifera* para o controle de ácaros parasitas, não se observou efeito de mortalidade das abelhas,

contudo foi observado efeito direto sobre a colônia, como redução de 50% da área de cria, essa redução foi resultado do envenenamento por azadiractina, além disso 50% das colônias tratadas com óleo de neem a 10% perderam suas rainhas (MELATHOPOULOS et al., 2000).

3.5.3.2 Produtos fitossanitários naturais comerciais e *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* adicionados a pasta Cândi

Nenhum dos produtos avaliados reduziu a longevidade quando adicionados a pasta Cândi (Tabela 12). Embora não se tenha observado diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, observou-se variação de longevidade de 56,50 h (Calda Bordalesa) a 100,37 h (Rotenat[®]) (Tabela 12).

Embora não tenha sido objeto de avaliação deste estudo, a Calda Bordalesa pode ter apresentado efeito repelente quando adicionada a dieta artificial, uma vez que se observou alteração da coloração da dieta, o que possivelmente tenha levado a alteração de outras características, como sabor, odor. Isso, provavelmente tenha repellido a alimentação o que ocasionou a redução da longevidade.

Tabela 12 - Longevidade em horas (\pm EP) de operárias de *Apis mellifera* após fornecimento de pasta Cândi misturada aos produtos fitossanitários naturais comerciais na concentração recomendada. Temperatura 30 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2012.

Tratamento	Longevidade (h)
Testemunha A ¹	80,20 \pm 9,42 ab
Testemunha B ²	84,3 \pm 11,58 ab
Btk ³	100,10 \pm 11,58 a
Rotenat [®]	100,37 \pm 13,95 ab
Pironat [®]	59,10 \pm 6,48 ab
Natuneem [®]	79,17 \pm 11,13 ab
Naturalho [®]	95,16 \pm 13,20 ab
Calda Bordalesa	56,50 \pm 7,88 b
CV %	20,67

Dados transformados em logaritmo. Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$); ¹A- Adição de água destilada esterilizada à pasta Cândi; ²B- Pasta Cândi pura; ³*Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki*

O produto Rotenat[®] e Btk apresentaram as maiores médias de longevidade 100,37 horas e 100,10 horas, respectivamente. Resultados diferentes do observado nesse estudo foram verificados em avaliação de diferentes concentrações de Btk, obtido do produto Dipel[®] PM, sobre a mortalidade de *A. mellifera*. Quando adicionado à pasta cândi, na concentração 2,5g/60g de pasta Cândi, a longevidade média observada foi de 73,98 h, não diferindo significativamente das concentrações de 0,25, 0,50, 1,00, 5,00, 10,0, 20,0 mg/ 60g de pasta Cândi, indicando o elevado efeito do Btk na mortalidade das abelhas (BRIGUENTI et al., 2007).

Avaliou-se no presente estudo a seletividade fisiológica dos produtos fitossanitários naturais a *A. mellifera*, contudo, também se deve levar em consideração a seletividade ecológica, evitando o contato dos produtos com as abelhas. Para tal, a aplicação deve, preferencialmente, ser realizada no final da tarde, período em que a taxa de forrageamento é menor, além disso deve-se realizar o fechamento da colméia, fornecendo alimentação artificial durante as pulverizações (FOERSTER, 2002; XAVIER, 2009).

Os produtos fitossanitários naturais comerciais avaliados no presente estudo não apresentaram efeito direto sobre a mortalidade larval de *A. gemmatalis*. Contudo, os produtos Natualho[®] e a Calda Bordalesa reduziram significativamente a formação de pupas e, Natuneem[®] e a Calda Bordalesa reduziram o percentual de emergência. Esses produtos, apesar de não causarem mortalidade na fase larval, possivelmente contribuem para a redução das populações seguintes da praga, o que pode representar um fator importante a longo prazo.

Entre os produtos avaliados no presente estudo, Natuneem[®], Natualho[®] e Rotenat[®] são os mais adequados para associação com Btk, visto que não apresentaram efeito negativo sobre a toxicidade dos cristais de Btk além de causarem efeito positivo sobre a formação de UFC/mL.

Além disso, nenhum dos produtos avaliados reduziu de maneira significativa a longevidade das operárias de *A. mellifera*, contudo sugere-se a realização de novos experimentos que avaliem os efeitos dos produtos sobre as abelhas em ambiente de campo, os efeitos sobre a estruturação da colônia e a toxicidade para operárias em diferentes idades, de modo que se garanta a segurança as abelhas quando da utilização desses produtos fitossanitários naturais comerciais.

3.6 CONCLUSÕES

Os produtos Pironat[®] e Calda Bordalesa reduziram as UFC/mL, enquanto Natuneem[®], Rotenat[®] e Natualho[®] aumentaram as UFC/mL.

Apenas a Calda Bordalesa afetou negativamente a toxicidade dos cristais de Btk.

Nenhum dos produtos fitossanitários naturais comerciais, nas duas formas de aplicação, alterou a longevidade de *A. mellifera*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de produtos fitossanitários naturais constitui uma alternativa promissora para o controle de insetos praga. Assim, o estudo de extratos vegetais ou de produtos comerciais a base de metabólitos secundários de plantas com potencial inseticida e que sejam de fácil obtenção pelos produtores são importantes para a consolidação de tal prática. Além disso, o conhecimento dos efeitos de tais produtos sobre organismos não alvos também se faz necessário, pois permite estabelecer estratégias de associação com as demais práticas empregadas no Manejo Integrado de Pragas com devida segurança ambiental.

No presente estudo não foi observado efeito dos extratos vegetais avaliados sobre o desenvolvimento de *A. gemmatalis*. Contudo, estudos futuros do potencial inseticida dessas plantas podem ser desenvolvidos utilizando-se diferentes soluções extratoras e diferentes concentrações.

A utilização dos extratos de trombeta e pimenta em conjunto com Btk pode ser positiva no controle de insetos praga, pois os extratos não apresentam efeito negativo sobre os cristais de Btk e a utilização conjunta provoca o alongamento do período ovo-adulto de *A. gemmatalis*. Porém esses extratos afetaram negativamente os esporos de Btk, de modo que torna-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas a campo para que se possa verificar se o efeito sobre os esporos observado em laboratório representa um obstáculo para a utilização conjunta desses extratos com Btk.

Além disso, os extratos vegetais de trombeta e pimenta, indicados para associação com Btk, também foram considerados seletivos à operárias adultas de *A. mellifera*, de modo que sua utilização além de ser importante no controle de pragas não afeta a sobrevivência e assim o serviço de polinização realizado por estes organismos.

Dentre os produtos comerciais avaliados, sugere-se a utilização de Natuneem[®] e Natualho[®] em associação com *B. thuringiensis*, pois mesmo não apresentando atividade direta sobre a mortalidade larval de *A. gemmatalis*, ambos apresentaram efeitos sobre outros parâmetros que comprometem o desenvolvimento do inseto, não apresentaram efeito negativo sobre esporos e cristais da bactéria e também foram seletivos a *A. mellifera*, uma vez que não apresentaram efeito sobre a longevidade. Além disso, considerando-se que numa possível aplicação em campo encontra-se insetos em diferentes instares os produtos podem causar estress nos instares mais resistentes a Btk, contribuindo para a ação da bactéria.

REFERÊNCIAS

ADEL, Manal M. SEHNAL, Franti S. JURZYSTA, Marian. Effects of Alfalfa Saponins on the Moth *Spodoptera littoralis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 4, p. 1065-1078, 2000.

ALECIO, Marcio R.; FAZOLIN, Murilo; COELHO NETTO, Rosalee A.; CATANI, Valdomiro; ESTRELA, Joelma L.V.; ALVES, Suzane B.; CORREA, Raquel S.; ANDRADE NETO, Romeu C. GONZAGA, Adriana D. Ação inseticida do extrato de *Derris amazonica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v.40, n.4, p.719-728, out-dez. 2010.

ALVES, Luis F.A.; PINTO, Fabiana G.S. Interações entre agroquímicos e bactérias entomopatogênicas. In. 8º SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro, 2003. p. 41.

ALVES, Marcos N. SARTORATTO, Adilson. TRIGO, José R. Scopolamine in *Brugmansia Suaveolens* (Solanaceae): Defense, Allocation, Costs, and Induced Response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.2, n. 33, p. 297-309, fev. 2007.

ALVES, Sérgio B.; MORAES, Sérgio A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, Sérgio B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-797.

ALVES, Sérgio B. MOINO JR, Alcides. ALMEIDA, José E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, Sérgio B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.

APPEL, Heidi M. Phenolics in Ecological Interactions: The Importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 7, p. 1521-1552, jul. 1993.

AURICCHIO, Mariângela T.; BUGNO, Adriana; BARROS, Silvia B. M; BACCHI, Elfriede M. Atividade Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 1, p.76-81, out. 2007.

AYRES, Manuel; AYRES, Manuel Jr.; AYRES, Daniel L.; SANTOS, Alex A.S. **BioEstat 5.0 Aplicações nas áreas de Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BANSO, A.; ADEYEMO, S. O. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n.15, p. 1785-1787, ago. 2007.

BAPTISTA, Ana P.M.; CARVALHO, Geraldo A.; CARVALHO, Stephan M.; CARVALHO, César F.; FILHO, Júlio S. S. B. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, Santa Maria v.39, n.4, p.955-961, jul. 2009.

BARBEHENN, Raymond V. MARTIN, Michael M. Tannin Sensitivity in Larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): Roles of the Peritrophic Envelope and Midgut Oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 8, p. 1985- 2001, fev. 1994.

BASWA, M.; RATH, C.C.; DASH, S.K.; MISHRA, R.K. Antibacterial Activity of Karanj (*Pongamia pinnata*) and Neem (*Azadirachta indica*) Seed oil: a preliminary report. **Microbios**, Cambridge, v. 105, n. 412, p. 183-189, 2001.

BOBROWSKI, Vera L.; FIUZA, Lidia M.; PASQUALI, Giancarlo; BOSANESE-ZANETTINI, Maria H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.843-850, set-out, 2003.

BOIÇA JUNIOR, Arlindo L.; MEDEIROS, C.A.M.; TORRES, Adalci L.; CHAGAS FILHO, Norton R. Efeito de Extratos Aquosos de Plantas no Desenvolvimento de *Plutella xulostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em Couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.45-50, jan./mar., 2005.

BONJEAN, K.; De PAUW-GILLET, M.C.; DEFRESNE, M.P.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; DASSANNEVILLE, L.; BAILLY, C.; GREIMERS, R.; WRIGHT, C.; QUETIN-LECLERCQ, J.; TITS, M.; ANGENOT, L. The DNA Intercalating Alkaloid Cryptolepine Interferes with Topoisomerase II and Inhibits Primarily DNA Synthesis in B16 Melanoma Cells. **Biochemistry**, v. 37, n. 15, p. 5236-5146, 1998.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sargeet S.; SOBERÓN, Mario. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cit toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Oxford, v. 49, n.4, p. 423-435, jan. 2007.

BRAVO, Alejandra; LIKITVIVATANAVONG, Supaporn; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n.7, p.423-431, jul. 2011.

BRIGHENTI, Deodoro M.; CARVALHO, César F.; CARVALHO, Geraldo A.; BRIGUENTI,

Carla R.G.; CARVALHO, Stephan M. Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para Adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 279-289, mar./abr., 2007.

BRUNHEROTTO, Rogério; VENDRAMIM, José D.; ORIANI, Maria A. Efeito de Genótipos de Tomateiro e de Extratos Aquosos de Folhas de *Melia azedarach* e sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 5, p.784-79, set.-out. 2010.

CARVALHO, H.H. WIEST, J.M. CRUZ, F.T. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.12, n.1, p.8-12, jan.-mar. 2010.

CAVALCANTE, Giani M. MOREIRA, Albert F. C. VASCONCELOS, Simão D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.9-14, jan. 2006.

CAVALCANTI Ricardo S.; MOINO JUNIOR, Alcides; SOUZA, Giselle C.; ARNOSTI, André. Efeito dos Produtos fitossanitários Fenpropatrina, imidaclopride, Iprodione e Tiametoxam sobre o Desenvolvimento do Fungo *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3, p.17-22, jul./set., 2002.

CINTRA, Pricila; MALASPINA, Osmar; PETACCI, Fernando; FERNANDES, João B.; BUENO, Odair C.; VIEIRA, Paulo C.; SILVA, Maria F.G.F. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to Workers of *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n. 1, p.115-118, jan. 2002.

COWAN, Marjorie M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.4, p.564-582, oct. 1999.

CUSHNIE, Tim T. P. LAMB, Andrew J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, n.5, p. 343-356, nov. 2005.

DAROLT, Moacir Roberto. **Agricultura Orgânica: Inventando o futuro**. Londrina: IAPAR, 2002, 250 p.

DEQUECH, Sônia T. B.; EGEWARTH, Rafael; SAUSEN, Carla D.; STURZA, Vinícius S. RIBEIRO, Leandro P. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucífera. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.2, p.551-554, mar.-abr. 2009.

DOUGHERTY, Edward M.; REICHELDERFER, Charles F.; FAUST, Robert M. Sensitivity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to various insecticides e herbicides. **Journal of Invertebrate Pathology**, United State, v. 17, n.2, p.292-293, 1971.

DRUCKER, Adam G. Economic Valuation of Bee Pollination Services: Implications for farm Management and Policy. In FREITAS, Breno M. PORTELA, Júlio O.B. (Eds.) **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 125-134, 2004.

EFROM, Caio F.S.; REDAELLI, Luiza R.; MEIRELLES, Rafael N.; OURIQUE, Cláudia B. Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, in organic farming. **Crop Protection**, v. 30, p. 1162-1167, 2011.

EL-MOURSY, A.A.; SHARABY, A.; AWAD, H.H. Some chemical additives to increase the activity spectrum of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel 2x) against the rice moth *Corcyra cephalonica*. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, Turkey, v. 6, n. 2, p. 149-154, 1993.

FAO (Food and Agriculture Organization). Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In FREITAS, Breno M. PORTELA, Júlio O.B. (Eds.) **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 19-25, 2004.

FARAH M.O.; HASSAN, A.B.; HASHIM, M.M.; ATTA, A.H. Phytochemical and pharmacological studies on the leaves of *Ricinus communis*. **Egyptian Journal Veterinary Science**, Cairo, v.24, n.2, p.169–180, 1988.

FELIX, Fabiana, F. **Comportamento do Cobre Aplicado no solo por Calda Bordalesa**. 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FOERSTER, Luis M. Seletividade de Inseticidas a Predadores e Parasitoides. In: PARRA, J. et al. **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p. 95-103.

GALLO, Domingos et al. **Entomologia Agrícola**, v.10. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GAZZONI, Décio L.; HULSMEYER, Alexander; HOFFMANN-CAMPO, Clara B. Efeito de Diferentes Doses de Rutina e Quercetina na Biologia de *Anticarsia gemmatalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.7, p.673-681, jul. 1997.

GILL, Sargeet S. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n.1, p. 69-74, jan./fev. 1995.

GIUSTOLIN, Teresinha A.; VENDRAMIM, José D.; ALVES, Sérgio B.; VIEIRA, Solange A. Efeito Associado de Genótipo de Tomateiro Resistente e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* Meyrick (Lep., Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.3, p. 461-465, set. 2001.

GLEISSMAN, Stephen R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**, 3ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

GONÇALVES, A. L. ALVES FILHO, A. MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005.

GONÇALVES-GERVÁSIO, Rita de C. R. **Efeito de Extratos de *Trichilia pallida* Swartz e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta Absoluta* (Meyrick) e seu parasitoide *Trichogramma pretiosum* Riley.** 2003. 100f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GONÇALVES-GERVÁSIO, Rita de C.R. VENDRAMIM, José D. Efeito de Extratos de Meliáceas Sobre o Parasitóide de Ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, n.5, p.607-612, 2004.

GONÇALVES-GERVÁSIO, Rita de C.R. VENDRAMIM, José D. Bioatividade do Extrato Aquoso de Sementes de Nim sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Três Formas de Aplicação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 28-34, 2007.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.69, n.4, p.487-497, 1976.

HABIB, Mohamed E.M; ANDRADE, Carlos F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES Sérgio B.(Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.p. 383-427.

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource technology**, Amsterdam, v.64, n.1, p. 7-15, 1998.

HOFFMANN-CAMPO, Clara B.; OLIVEIRA, Edilson B.; MOSCARDI, Flávio. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, **Documentos 10**, 21p. 1985.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L. & OLIVEIRA, E.B. Pragas de Soja no Brasil e seu Manejo Integrado, Embrapa Soja, Londrina, **Circular Técnica 30**, 70p. 2000.

JOSHI, Bishnu; LEKHAK, Sunil; SHARMA, Anuja. Antibacterial Property of Different Medicinal Plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, Nepal, v. 5, n. 1, p.143-150, 2009.

KAROU, Damintoti; SAVADOGO, Aly; CANINI, Antonela; YAMEOGO, Saydou, MONTESANO, Carla; SIMPORE, Jacques; COLIZZI, Vittorio; TRAORE, Alfred S. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, n.12, p. 1452-1457, dez., 2005.

KEVAN, Peter G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Ecosystems and Environment**, v.74, n.1, p. 373-393, 1999.

KNAAK, Neiva. TAGLIARI, Marines S. FIUZA, Lidia M. Histopatologia da Interação de *Bacillus thuringiensis* e Extratos Vegetais no Intestino Médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.83-89, jan./mar., 2010.

KNAAK, Neiva; TAGLIARI, Marines S.; MACHADO, Vilmar; FIUZA, Lidia M. Atividade Inseticida de Extratos de Plantas Medicinais Sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **BioAssay**, Londrina, v.7,n.1, p.1-6, 2012.

LEFAHAL, Mostafa; BENAHMED, Merzoug; LOUAAR, Souheila; ZALLAGUI, Amar; DUDDECK, Helmut; MEDJROUBI, Kamel; AKKAL, Salah. Antimicrobial Activity of *Tamarix gallica* L. Extracts and Isolated Flavonoids. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 289-292, 2010.

LEONARDO, Mario R.; SILVA, Lea A. B.; FILHO, Mario T.; BONIFACIO, Kleber C.; ITO Izabel Y. In vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of a Castor Oil – Based Irrigant. **Journal of Endodontics**, v. 27, m. 12, p. 717-719, dez. 2001.

LIMA, Marcileyne P. L.; OLIVEIRA, José V.; JUNIOR, Manoel G.C.G.; MARQUES, Edmilson J. CORREIA, Alicely A. Bioatividade de Formulações de nim (*Azadirachta indica* A. Juss, 1797) e de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* em Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1381-1389, nov./dez., 2010.

LIMA, Bruno M.F.V; MOREIRA, José O.T.; PINTO, Helder C.S. Avaliação de Extratos Vegetais no Controle de Mosca Branca em Tomate. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 36-42, out-dez. 2011.

LOGUERCIO, Andrea P.; BATTISTIN, Alice; VARGAS, Agueda C.; HENZEL Andréia; WITT, Niura M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.2, p.371-376, mar-abr, 2005.

LORD, Jeffrey C. UNDEEN, Albert. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Toxins by Dissolved Tannins. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 19, n.5, p. 1547-1551, 1990.

LUZ, Francisco J. F. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. **Annual Review of Genetics.**, v.37, p.409-433, 2003.

MAIRESSE, Luiz A. da S. **Avaliação da Bioatividade de Extratos de Espécies Vegetais, Enquanto Excipientes de Alelóquímicos**. 2005, 340f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MARONEZE, Daniel M. GALLEGOS, Dileimar M.N. Efeito de extrato aquoso de *Melia azedarach* no desenvolvimento das fases imatura e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 537-550, jul./set. 2009.

MARTNEZ, Sueli S. **O Nim – *Azadirachta indica* – um inseticida natural**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2008.

MELATHOPOULOS, Adony P.; WINSTON, Mark L.; WHITTINGTON, Robin; HIGO, Heather; LE DOUX, Monique. Field evaluation of neem and canola oil for the selective

control of the honey bee mite parasites *Varroa jacobsoni* and *Acarapsis woodi*. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n.3, p. 559-567, jun. 2000.

MERIGA, Balaji. MOPURI, Ramgopal. MURALIKRISHNA, T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.412-420, 2011.

MORANDI FILHO, Wilson J.; BOTTON, Marcos; GRUTZMACHER, Anderson D.; GIOLO, FABRIZIO P.; MANZONI, Cristiane G. Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1072-1078, jul-ago, 2006.

MOSSINI, Simone A.G.; KEMMELMEIER, Carlos. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v 24, n.1, p. 139-48, dez. 2005.

Natural Rural. **Natuneem**. Disponível em www.naturalrural.com.br/produtos Acesso em 27 de março de 2011a.

Natural Rural. **Rotenat CE**. Disponível em www.naturalrural.com.br/produtos Acesso em 20 de abril de 2011b.

Natural Rural. **Naturalho**. Disponível em www.naturalrural.com.br/produtos. Acesso em 26 de março de 2011c.

NAVON, A. HADE, J.D. FEDERICI, B.A. Interactions Among *Heliothis virescens* Larvae, Cotton Condensed Tannin and the Cryla(c) 6-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 11, p. 2485- 2499, 1993.

OLIVEIRA, Marcelo S.S.; ROEL, Antonia R.; ARRUDA, Eduardo J.; MARQUES, Ana S. Eficiência de Produtos Vegetais no Controle da Lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 326-331, mar./abr., 2007.

PENTEADO, Silvio R. **Defensivos Alternativos e Naturais** . Ed. Livros Via Orgânica: Campinas, SP, 3ª ed, 2007.

PESSOA, Alciane da S. **Bioatividade de Extratos Vegetais sobre Cristais de *Bacillus thuringiensis* Berl. 1915 e sobre *Anticarsia gemmatilis* Hub. 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).** 2012. 40f. Monografia (Especialização em Controle Biológico) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos, 2012a.

PESSOA, Gustavo M. **Associação de *Bacillus thuringiensis* Subesp. *kurstaki* Berliner, 1915 e Extratos Vegetais para Controle de *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae).** 2012. 45f. Monografia (Especialização em Controle Biológico) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos, 2012b.

PINHEIRO, José N. FREITAS, Breno M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis.** Rio de Janeiro, v.14, n.1, p.266-281, mar. 2010.

POLANCZYK, Ricardo A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith).** 2004. 158f. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

PRAÇA, Lilian B.; BATISTA, Andréa C.; MARTINS, Érica S.; SIQUEIRA, Cláudia B.; DIAS, Daniel G.S.; GOMES, Ana C.M.M.; FALCÃO, Rosana; MONNERAT, Rose G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.

RAJASEKARAN, C.; MEIGNANAM, E.; VIJAYAKUMAR, V.; KALAIVANI, T.; RAMYA, S.; PREMKUMAR, N.; SIVA, R.; JAYAKUMARARAJ, R. Investigations on Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae): A Traditional Medicinal Plant of India. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 12, p. 1213-1217, 2008.

RATHNAYAKE, I. V. N.; MEGHARAJ, M.; BOLAN, N.; NAIDU, R. Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. **International Journal of Civil and Environmental Engineering**, v.2, n.4, p. 191-195, 2010.

RIZWAN-UL-HAQ, Muhammad; HU, Qiong B.; HU, Mei Y.; LIN, Qing S.; ZHANG, Wan L. Biological impact of harmaline, ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 82, p. 327-334, 2009.

ROTHER, Débora; SOUZA, Tiago F.; MALASPINA, Osmar; BUENO, Odair C.; SILVA, Maria F.G.F.; VIEIRA, Paulo C.; FERNANDES, João B. Suscetibilidade de operárias e larvas de abelhas sociais em relação a ricinina. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v.99, n.1, p.61-65, 30, mar. 2009.

SAITO, Maria L.; LUCCHINI, Franco. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.

SAITO, Maria L.; POTT, Arnildo; FERRAZ, José M.G.; NASCIMETO, Roseli S. Avaliação de Plantas com Atividade Deterrente Alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 14, p.1-10, jan./dez. 2004.

SCALBERT, Augustin. Antimicrobial Properties of Tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SETLOW, Peter. Spore Germination. **Current Opinion in Microbiology**. v. 6, p. 550–556, 2003.

SEIM – **Boletim Informativo da Secretaria de Estado da Indústria, do Comércio e Assuntos do Mercosul**, n. 25, jul 2009. Disponível em www.seim.pr.gov.br/arquivos/File/Boletim/Boletim_Seim_JULHO_web.pdf. Acessado em 10 de fevereiro de 2011.

SILVA, Everton R. L. **Efeito de produtos alternativos sobre *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2010. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

SILVA, Everton R. L.; ALVES, Luis F.A.; MARTINELO, Leonardo; FROMENTINI, Marina A.; MARCHESE, Luiz P.C.; PINTO, Fabiana G.S.; POTRICH, Michele; NEVES, Pedro M.O.J. Natural phytosanitary products effects on *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Berliner). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 1, p. 2891-2904, 2012.

SILVA, F. de A. S. **ASSISTAT** versão 7.6 beta (2012). Campina Grande-PB: Assistência Estatística, Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Campina. Disponível em: < <http://www.assistat.com/index.html> >. Acesso em: 20 jul. 2012.

SILVA, Roberto C.P.A.; PEIXE, Blênio C.S. Estudo da Cadeia Produtiva do Mel no Contexto da Apicultura Paranaense – uma Contribuição para a Identificação de Políticas Públicas Prioritárias. **Secretaria de Estado a Agricultura e do Abastecimento**. Curitiba: SEAB, 2012.

SINGARAVELAN, Natarajan; INBAR, Moshe; NE'EMAN, Gidi; DISTL, Melanie; WINK, Michael; IZHAKI, Ido. The Effects of Nectar–nicotine on Colony Fitness of Caged Honeybees. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.32, n. 1, p. 49-58, jan. 2006.

SINGH, G. RUP, P. J. KOUL, O. Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, p. 351-357, 2007.

SIQUEIRA, Eloibisio S. **Atividade Inseticida de Extratos de *Eugenia uniflora* (L.) (Myrtales: Myrtaceae) Obtidos por Diferentes Métodos de Extração sobre o *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae)**. 2012. 36f. Monografia (Especialização em Controle Biológico) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2012.

SIVAPALAN, P. GNANAPRAGASAM, N.C. Influence of copper on the development and adult emergence of *Homona coffearia* (Lepidoptera: Tortricidae) reared in vitro. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.28, n.1, p. 59-63, 1980.

THOMAS, Claire J.; CALLAGHAN, Amanda. The use of garlic (*Allium sativa*) and lemon peel (*Citrus limom*) extracts as *Culex pipiens* larvacides: Persistence and interaction with an organophosphate resistance mechanism. **Chemosphere.**, v.39, n 14, p. 2489-2496, dec. 1999.

THULER, Robson T. DE BORTOLI, Sergio A. BARBOSA, José C. Eficácia de Inseticidas Químicos e Produtos Vegetais Visando ao Controle de *Plutella xylostella*. **Científica**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 166 - 174, 2007.

TORRES, Adalci L.; BARROS, Reginaldo; OLIVEIRA, José V. Efeito de Extratos Aquosos de Plantas no Desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n.1, p.151-156, mar. 2001.

TORRES, Adalci L.; BOIÇA JUNIOR, Arlindo L.; MEDEIROS, Cesar A.; BARROS, Reginaldo. Efeito de Extratos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no Desenvolvimento e Oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.3, p.447-457, mai. 2006.

TSUCHIYA, Hironori; SATO, Masaru; MIYAZAKI, Takashi; FUJIWARA, Shuu; TANIGAKI, Shingo; OHYAMA, Masayoshi; TANAKA, Toshiyuki; IINUMA, Munekazu. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Ethnopharmacol**, v.50, p. 27–34, 1996.

VASCONCELOS, Geraldo J. N. JUNIOR, M. G.C. G. BARROS, Reginaldo. Extratos aquosos de *Leucaena leucocephala* e *Sterculia foetida* no controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.5, p.1353-1359, set.-out. 2006.

VIEIRA, L. et al. Efeito de Extratos de *Aristolochia lagesiana* (Aristolochiaceae) sobre a Lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.2, p.245-250, abr./jun., 2009.

WANDSCHEER, Alana C. D.; BORELLA, Junior; BONATTI, Luziana C.; PASTORINI, Lindamir H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 25, n.1, p. 25-30, jan- mar. 2011.

WILSON, Gary R. BENOIT, Thomas G. Alkaline pH Activates *Bacillus thuringiensis* Spore. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 87-89, 1993.

WOLFF, Luis F. **Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 38p. (Documento 244).

XAVIER, Vânia Maria. **Impacto de inseticidas botânicos sobre *Apis melífera*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 43 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.