

IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO A PARTIR
DAS INTERAÇÕES NATURAIS: PARASITOIDE-HOSPEDEIRO E INTERAÇÃO INSETO-
PLANTA

por

THIAGO JOSÉ DE SOUZA ALVES

(Sob orientação da professora Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

RESUMO

Buscando alternativas de controle, frente aos efeitos deletérios ocasionados pelos inseticidas sintéticos, avaliamos interações naturais existentes nos agroecossistemas com o intuito de identificar novas moléculas com potencial bioinseticida. Para tanto, avaliamos a interação parasitoide-hospedeiro, através do qual utilizamos como modelo experimental o ectoparasitoide *Bracon vulgaris* e, posteriormente, avaliamos a composição e mortalidade acarretada pelas toxinas vegetais existentes nos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Corymbia citriodora*, *Pelargonium graveolens* e *Amyris balsamifera*; onde, através de testes de toxicidade, propusemos um bioinseticida, preliminarmente denominado *Triunvirato*. Por fim, avaliamos os impactos fitotóxicos desse bioinseticida bem como sua interferência na ação de parasitismo de *Psytalia concolor*, um endoparasitoide de *Ceratitis capitata*, uma praga agrícola de importância global já registrada infestando mais de 350 hospedeiros vegetais. Caracterizamos as estruturas de produção e estocagem do veneno de *B. vulgaris* e então, entendemos o funcionamento do aparato de veneno e a ação da sua toxina, que acarreta uma paralisia irreversível ao seu hospedeiro, resultando posteriormente, sua morte. Quanto ao bioinseticida

proposto, concluímos que este é dotado de seletividade em favor do inimigo natural, podendo ser aplicado em conformidade com o parasitoide *P. concolor*, além de não desenvolver quaisquer efeitos fitotóxicos à planta onde a interação parasitoide-hospedeiro ocorre.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemas bioinspirados, toxinas, seletividade fisiológica, bioinseticida, histofisiologia, *Bracon vulgaris*, *Psytalia concolor*, histoquímica.

IDENTIFICATION OF MOLECULES WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL FROM
NATURAL INTERACTIONS PARASITOID-HOST AND INSECT-PLANT

por

THIAGO JOSÉ DE SOUZA ALVES

(Under the Direction of Professor Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE)

ABSTRACT

Searching for control alternatives, in view of the deleterious effects caused by synthetic insecticides, we evaluated the natural interactions in agroecosystems in order to identify new molecules with bio - insecticidal potential. For this, we evaluated the parasitoid-host interaction, through which we used the ecto parasitoid *Bracon vulgaris* as an experimental model and later evaluated the composition and mortality caused by the plant toxins present in the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Corymbia citriodora*, *Pelargonium graveolens* and *Amyris balsamifera*; where, through toxicity tests, we proposed a bioinsecticide, preliminarily called *Triunvirato*. Finally, we evaluated the phytotoxic impacts of this bioinsecticide as well as its interference in the parasitism of *Psytalia concolor*; an endo parasitoid of *Ceratitis capitata*, an agricultural pest of global importance already registered infesting more than 350 vegetable hosts. We uncover the structures of production and storage of venom of *B. vulgaris* and then we understand the functioning of the venom apparatus and the action of its toxin, which causes an irreversible paralysis to its host, resulting in its death. As for the proposed bioinsecticide, we conclude that it is endowed with selectivity in favor of the natural enemy and can be applied in

agreement with the *P. concolor* parasitoid, besides not developing any phytotoxic effects to the plant where the parasitoid-host interaction occurs.

KEY WORDS: Bioinspired system, toxins, physiological selectivity, bioinsecticide, histophysiology, *Bracon vulgaris*, *Psytalia concolor*, histochemistry.

IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO A PARTIR
DAS INTERAÇÕES NATURAIS: PARASITOIDE-HOSPEDEIRO E INTERAÇÃO INSETO-
PLANTA

por

THIAGO JOSÉ DE SOUZA ALVES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2018

IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO A PARTIR
DAS INTERAÇÕES NATURAIS: PARASITOIDE-HOSPEDEIRO E INTERAÇÃO INSETO-
PLANTA

por

THIAGO JOSÉ DE SOUZA ALVES

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Pilar Medina – UPM

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO A PARTIR
DAS INTERAÇÕES NATURAIS: PARASITOIDE-HOSPEDEIRO E INTERAÇÃO INSETO-
PLANTA

por

THIAGO JOSÉ DE SOUZA ALVES

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Examinadores: _____
Maria Aparecida Barreto Lopes Seabra – UFPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Paulo Roberto Ramos Barbosa – UFRPE

Franklin Magliano da Cunha – FAFIRE

DEDICATÓRIA

A mi querida y genial Pilar Medina, eres grande.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo destinado a realização desta pesquisa; bem como ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (BEX 7003/1503).

Agradeço aos professores Valéria Wanderley, Álvaro Teixeira e Pilar Medina pela orientação conferida.

Aos meus familiares e amigos, obrigado pelo suporte e incentivo.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
2 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS ÓRGÃO DE PRODUÇÃO, ESTOCAGEM E DISTRIBUIÇÃO DE TOXINA DO ECTOPARASITOIDE <i>Bracon vulgaris</i>	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
AGRADECIMENTOS	20
LITERATURA CITADA.....	20
3 COMPOSIÇÃO E TOXICIDADE DE TRIUNVIRATO: UMA MISTURA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA A MOSCA DAS FRUTAS, <i>Ceratitis capitata</i> (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29

	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
	AGRADECIMENTOS.....	42
	LITERATURA CITADA.....	42
4	ECOTOXICIDADE DE UM BIOINSETICIDA BOTÂNICO SOBRE O PARASITOIDE <i>Psytalia concolor</i> (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)	55
	RESUMO	56
	ABSTRACT	57
	INTRODUÇÃO	58
	MATERIAL E MÉTODOS	61
	RESULTADOS	66
	DISCUSSÃO	68
	AGRADECIMENTOS.....	71
	LITERATURA CITADA.....	71
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O conhecimento acerca dos efeitos deletérios relacionados as intoxicações provocadas por inseticidas, somado a insatisfação pertinente a contaminação ambiental e alimentar, desencadearam uma busca por alternativas de controle de pragas que fossem ecologicamente viáveis (Siqueira & Kruse 2008, Ootani *et al.* 2013). Entre estas alternativas, se destacaram as interações naturais, como o controle biológico realizado pelos parasitoides, que são responsáveis pela redução natural das populações de praga; bem como, os produtos de origem botânica, como os óleos essenciais, substâncias defensivas oriundas do metabolismo secundário das plantas e que apresentam elevada propriedade inseticida (Parra *et al.* 2002, Bakkali *et al.* 2008).

Óleos essenciais são misturas de compostos de origem botânica distintas e que, devido a sua composição, apresentam a propriedade de atuar em diversos modos e sítios de ação nos insetos, podendo exercer efeitos biológicos (mortalidade e inanição) (Amer & Mehlhorn 2006, Koul *et al.* 2008, Palacios *et al.* 2009), comportamentais (repelência, dissuasão e inibição da oviposição) (Müller *et al.* 2009, Brari & Thakur 2016) e fisiológicos (regulação do crescimento e alterações morfo-histológicas) (Hummelbrunner & Isman 2001, Alves *et al.* 2014, Cruz *et al.* 2015). Como afirmam Tripathi *et al.* (2009) e Isman (2008), existem mais de 3.000 toxinas botânicas já identificadas, em contradição, nos últimos 30 anos apenas um inseticida botânico, Neem, foi formulado, registrado e comercializado com êxito.

Entre os impasses relacionados à utilização de inseticidas sintetizados a partir de óleos essenciais e apontados como promissores ao controle de uma praga, se faz necessário avaliar se este poderia ser aplicado sem gerar efeitos indesejados, tais como danos a planta hospedeira ou ao

controle biológico realizado naturalmente pelos predadores e parasitoides da praga, já que alguns inseticidas, mesmo que de origem natural, são capazes de exercer efeitos fitotóxicos (Poonpaiboonpipat *et al.* 2013; Sarmiento-Brum *et al.* 2014) e também interagir com os inimigos naturais devido a liberação de moléculas odoríferas (voláteis), que se ligam a proteínas olfativas de recepção presentes nas antenas e palpos maxilares destes insetos, podendo atraí-los ou causar lhes repelência (Maia & Moore, 2011).

A mosca-das-frutas-do-mediterrâneo (*Medfly*), *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma praga agrícola de importância global que resulta, anualmente, duplos prejuízos econômicos tanto com a perda financeira investida em seu controle, como também prejuízos resultantes da invalidação comercial dos frutos danificados por este inseto ser muito polífago, já registrado infestando mais de 350 hospedeiros (Nash & Chapman, 2014). Assim, qualquer alternativa que se apresente como promissora ao controle de *C. capitata* deveria ser valorizada e avaliada para o manejo desta praga, pois, como relatam Couso-Ferrer *et al.* (2011) e Arouri *et al.* (2014) já foram identificadas populações de *Medfly* resistentes a inseticidas, até o momento, recomendados para seu controle, como Lambda-cyhalothrin, Fosmet, Methyl-chlorpyrifos, Deltamethrin e Spinosad, o que limita ainda mais o número de inseticidas indicados eficazmente para o controle desta praga.

A utilização de uma mistura de toxinas botânicas, de acordo com Isman (1997), poderia interferir no desenvolvimento da resistência apresentada por *C. capitata*, já que é muito mais difícil para um inseto conseguir destoxificar um complexo de substâncias que apenas um ou poucos componentes, além disso, uma mistura de toxinas botânicas pode apresentar mais de um modo de atividade e múltiplos sítios de ação.

No entanto, para viabilizar o uso de uma mistura de toxinas botânicas sobre *C. capitata*, se faz necessário, segundo Silva *et al.* (2002), considerar o efeito desse bioinseticida sobre o inimigo

natural da praga. *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae), é um importante parasitoide responsável pela redução natural de populações de Tefritídeos nos agroecossistemas frutíferos, dentre elas *Medfly* (Adán *et al.* 2007, Bengochea *et al.* 2014). Zapata *et al.* (2004) relataram que esse parasitoide é um excelente bioindicador para avaliação da toxicidade de inseticidas, sendo um excelente modelo experimental devido a sua sensibilidade quanto à interação com moléculas tóxicas.

Quanto aos programas de controle biológico, a utilização de parasitoides tem sido aplicado com sucesso através da análise da interação desses insetos e seus respectivos hospedeiros (Omwega *et al.* 1995, Barbalho & Penteado-Dias 1997, Parra *et al.* 2002). Dentre os parasitoides, os Braconídeos têm se destacado nos programas de controle de pragas agrícolas em agroecossistemas tropicais e subtropicais (Matthews 1974, Obonyo *et al.* 2008, Marinho *et al.* 2009, Wang *et al.* 2010). Diversas ordens de insetos de importância econômica, dentre elas Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera; são descritas sendo parasitadas por uma ou mais espécies de braconídeos (Matthews 1974, Foerster *et al.* 1999, Huber 2009, Marinho *et al.* 2009, Zikic *et al.* 2011).

Os Braconídeos constituem um grande e benéfico grupo de himenópteros parasitoides de alta relevância na redução natural de populações de pragas, com aproximadamente 40.000 espécies distribuídas por diversas regiões do mundo. Toscano & Carvalho (2000) e Carvalho *et al.* (2000) relataram que populações de *Bracon vulgaris* Ashmead, em condições naturais, foram encontradas expressando índices de parasitismo superiores a 70% em cultivos infestados com *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), enquanto que Vacari *et al.* (2012) afirmaram que no Brasil, o controle biológico da broca-da-cana, realizado pelo braconídeo *Cotesia flavipes* Cameron, é considerado o maior programa de controle biológico do mundo em relação a extensão

de área tratada, cerca de 3 milhões de hectares, constituindo um método eficiente capaz de resultar uma economia superior a 80 milhões de dólares por ano.

Uma questão a ser considerada em uma relação parasitoide/hospedeiro, é o fato de que quando desafiados por microrganismos e/ou parasitas os insetos hospedeiros apresentam mecanismos de defesa caracterizados pela reação humoral e celular. A reação humoral envolve a biossíntese de peptídeos antimicrobianos e proteínas (Hoffmann 2003, Lemaitre & Hoffmann 2007). As reações celulares, por sua vez, estão relacionadas a atuação dos hemócitos sobre os organismos invasores desencadeando a fagocitose, nodulação e, no caso de invasores maiores, a encapsulação (Lavine & Strand 2002, Stanley & Miller 2006, Wood & Jacinto 2007), o que pode levar a alterações na estrutura e no número dessas células e, conseqüentemente, refletir mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos do inseto (Qamar & Jamal 2009), desenvolvendo assim uma corrida armamentista ao longo do curso evolutivo entre parasitoides e seus respectivos insetos hospedeiros.

Durante o parasitismo alguns agentes imunossupressores são injetados no hospedeiro. Estes agentes incluem vírus endossimbióticos (polidnavirus - PDVs), partículas semelhantes a vírus (VLPs), fluidos ovarianos, teratocitos (derivado a partir de ovos injetados) e toxinas (Schmidt *et al.* 2001, Luo & Pang 2006). Em espécies ectoparasitoides desprovidos de PDVS e VLPs, o veneno parece ser o grande responsável por alterar a fisiologia e bioquímica do hospedeiro, provocar paralisia, e perturbar a homeostase do cálcio nos tecidos (Coudron *et al.* 2000, Rivers *et al.* 2002, Ergin *et al.* 2006).

Himenópteros, em sua maioria, apresentam uma grande diversidade funcional de toxinas, variando desde efeitos citolíticos a neurotóxicos (Moreau *et al.* 2009, Er *et al.* 2011); logo o conhecimento de seus principais constituintes pode servir de base para o desenvolvimento de novas metodologias de controle de pragas, como inseticidas sintéticos mais eficazes e seletivos.

Estudos tem mostrado a interferência da toxina de vespas sobre o sistema imunológico de grupos com grande importância agrícola e econômico, como os Lepidópteros (Nakamatsu *et al.* 2001, Nakamatsu & Tanaka 2003, Mochiah *et al.* 2003, Cai *et al.* 2004, Ibrahim & Kim 2006, Er *et al.* 2010) e dípteros (Eslin & Prevost 1996, Rivers *et al.* 2002).

Análises bioquímicas da toxina nos parasitoides *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Rivers *et al.* 2006), *Pteromalus puparum* (L.) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Wu *et al.* 2008), *Chelonus inanitus* (L.) (Hymenoptera, Braconidae) (Hochuli & Lanzrein 2001) e *Pimpla hypochondriaca* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Parkinson *et al.* 2002 a,b), revelaram que a composição é bastante complexa e variável dentro dos grupos parasitoides, podendo ser constituída por moléculas de baixo ou alto peso molecular e/ou compostos como aminas, peptídeos, proteínas, enzimas, e glicoproteínas; tal complexidade permite aos parasitoides se adaptar a várias espécies hospedeiras.

A diversidade funcional de toxinas nos braconídeos é notória, de modo que, componentes majoritários já foram isolados e avaliados quanto ao seu potencial biotecnológico. Kaeslin *et al.* (2010), por exemplo, afirmaram que *Chelonus inanitus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae), possui uma toxina composta por mais de 25 proteínas, com massas variando de 14 kDa a cerca de 300 kDa; bioensaios indicaram que esse composto exerce pelo menos três diferentes ações sobre insetos hospedeiros: interrompe o desenvolvimento larval, exerce efeito paralítico e altera a permeabilidade da membrana celular. Er *et al.* (2011), por sua vez, demonstraram que a toxina da vespa *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae) é capaz de induzir a morte celular nos hemócitos do seu hospedeiro natural *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) tanto na fase larval como pupal. Ratificando assim que o veneno de artrópodes constitui um vasto arsenal de neuropeptídios inseticidas (Schwartz *et al.* 2012).

Bracon vulgaris é um braconídeo ectoparasitoide gregário e larval que, junto a *Catolaccus grandis* Burks (Hymenoptera: Pteromalidae) constituem os principais agentes biológicos responsáveis pela redução natural das populações de bicudo, *A. grandis*, nos agroecossistemas do algodoeiro no Nordeste brasileiro (Ramalho *et al.* 2007, Ramalho *et al.* 2009b). As fêmeas de *B. vulgaris* paralisam as larvas de *A. grandis*, mediante inoculação de veneno, ainda não precisamente identificado, enquanto realizam a oviposição. Os ovos depositados externamente ao corpo do hospedeiro medem $0,92 \pm 0,03$ mm e apresentam coloração branco translúcido. Destes, eclodem larvas que imediatamente passam a se alimentar externamente do hospedeiro, inserindo as mandíbulas através da cutícula. Ao final do quarto instar a larva do parasitoide cessa a alimentação e inicia a construção de um casulo, dentro do qual, permanece por toda a fase de pupa e, posteriormente, emergem os adultos (Peydró *et al.* 1996, Ramalho *et al.* 2009 a, b).

A toxina de *B. vulgaris*, quando inoculada no hospedeiro, acarreta uma paralisia irreversível, favorecendo a redução natural das populações de *A. grandis* e lagarta rosada, *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) nos agroecossistema algodoeiro, assim, o conhecimento morfo-fisiológico do aparato de veneno desse parasitoide, bem como a caracterização bioquímica, identificação e concentração dos componentes presentes na toxina, poderá acarretar a descoberta de potenciais moléculas inseticidas e ou insetistáticas, cuja aplicação dos isolados, em *A. grandis*, e em outros insetos pragas, resulte um controle específico, eficaz e de forma limpa sobre o meio ambiente.

Nesse contexto, a partir de uma análise fisiológica dos insetos estudados, o objetivo desta investigação foi avaliar potenciais fontes de toxinas promissoras no desenvolvimento de formas alternativas de controle de pragas. Para tanto, nos baseamos em potenciais moléculas de diferentes naturezas: *I* - na interação parasitoide/hospedeiro desenvolvida por *B. vulgaris* e *A. grandis* e *II* -

no potencial inseticida e insetistático de toxinas botânicas. Assim, analisamos a morfo-histologia do aparato de veneno de *B. vulgaris* e o perfil bioquímico do produto secretado por este parasitoide. Quanto às toxinas de origem botânica investigamos a toxicidade, sobre a mosca-das-frutas-do-mediterrâneo, de um inseticida natural, desenvolvido por nossa equipe, a partir da mistura de toxinas presentes nos óleos essenciais de Capim limão (*Cymbopogon citratus*, Poaceae), Cedro (*Cedrus atlantica*, Pinaceae) e Eucalipto (*Corymbia citriodora*, Myrtaceae). Por fim, avaliamos a fitotoxicidade desse produto, bem como sua interferência sobre a capacidade benéfica de *P. concolor*.

Literatura Citada

- Adán, A., T. González, R. Bastante, F. Budia, P. Medina, P. Del Estal & E. Viñuela. 2007.** Efectos de diversos insecticidas aplicados en condiciones de laboratorio extendido sobre *Psytalia concolor* (Szèpligeti) (Hymenoptera: Braconidae). Bol. San. Veg. Plagas 33: 391-397.
- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia, C.A.G. Câmara & F.M. Cunha. 2014.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 89: 245-255.
- Amer, A. & H. Mehlhorn. 2006.** Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol. Res. 99: 466-472.
- Arouri, R., G. Le Goff, H. Hemden, V. Navarro-Llopis, M. M'saad, P. Castañera & F. Ortego. 2015.** Resistance to lambda-cyhalothrin in Spanish field populations of *Ceratitis capitata* and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. Pest Manag. Sci. 71: 1281-1291.
- Barbalho, S.M. & A.M. Pentead-Dias. 1997.** Análise morfológica do aparelho de veneno nos braconidae *cyclostome* (hymenoptera). Rev. Bras. Zool. 14: 65-71.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar 2008.** Biological effects of essential oils—a review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.
- Bengochea, P., F. Budia, E. Viñuela & P. Medina. 2014.** Are kaolin and copper treatments safe to the olive fruit fly parasitoid *Psytalia concolor*? J. Pest Sci. 87: 351-359.

- Brari, J. & D.R. Thakur. 2016.** Insecticidal potential properties of citronellol derived ionic liquid against two major stored grain insect pests. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4: 365-370.
- Cai, J., G.Y. Ye & C. Hu, C. 2004.** Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. *J. Insect Physiol.* 50: 315-322.
- Carvalho, S.L., W.D. Fernandes, P.N. Patel & M.E.M. Habib. 2000.** Respostas comparativas de *Bracon vulgaris* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) a diferentes macerados de plantas de algodão, em dois modos de exposição. *Rev. Agric.* 75: 41-53.
- Coudron, T.A., M.M.K. Wright, B. Puttler, S.L. Brandt & W. C. Rice. 2000.** Effect of the ectoparasite *Necremnus breviramulus* (Hymenoptera: Eulophidae) and its venom on natural and factitious hosts. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 890-897.
- Couso-Ferrer, F., R. Arouri, B. Beroiz, N. Perera, A. Cervera, V. Navarro-Llopis & F. Ortego. 2011.** Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 104: 1349-1356.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A.C. Teixeira, A.A. Correia, T.J.S. Alves, F.M. Cunha & M.O. Breda. 2015.** Histological and histochemical changes by clove essential oil upon the gonads of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Morphol.* 33: 1393-1400.
- Er, A., F. Uçkan, D.B. Rivers, E. Ergin & O. Sak. 2010.** Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocyte numbers, morphology, and viability of its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103: 273-282.
- Er, A., F. Uçkan, D.B. Rivers & O. Sak. 2011.** Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*. *J. Appl. Entomol.* 135: 225-236.
- Ergin, E., Uçkan, F., Rivers, D.B. & Sak, O. 2006.** In vivo and in vitro activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61: 87-97.
- Eslin, P. & G. Prevost. 1996.** Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. *J. Insect Physiol.* 42: 549-555.
- Foerster, L.A., A.K. Doetzer & M.R.F. Avanci. 1999.** Capacidade reprodutiva e longevidade de *Glyptapanteles muesebecki* (Blanchard) (Hymenoptera: Braconidae) parasitando lagartas de *Pseudaletia sequax* Franclemont (Lepidoptera: Noctuidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 28: 485 - 490.

- Hochuli, A. & B. Lanzrein. 2001.** Characterization of a 212 kD protein, released into the host by the larva of the endoparasitoid *Chelonus inanitus* (Hymenoptera, Braconidae). *J. Insect Physiol.* 47: 1313-1319.
- Hoffmann, J.A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33-38.
- Huber, J.T. 2009.** Biodiversity of Hymenoptera. Cambridge, Wiley-Blackwell, 632p.
- Hummelbrunner, L.A. & M.B. Isman. 2001.** Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- Ibrahim, A.M.A. & Y. Kim. 2006.** Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Insect Physiol.* 52: 943-950.
- Isman, M. B. 1997.** Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica*. 25: 339-344.
- Isman, M.B. 2008.** Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag. Sci.* 64: 8-11.
- Koul, O., S. Walia & G.S. Dhaliwal. 2008.** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4: 63-84.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Lemaitre, B. & J. Hoffmann. 2007.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 697-743.
- Luo, K. & Y. Pang. 2006.** *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *J. Insect Physiol.* 52: 795-806.
- Maia, M.F. & S.J Moore. 2011.** Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar. J.* 10: 2-15.
- Marinho, C.F., M.F. Souza-Filho, A. Raga & R.A. Zucchi. 2009.** Parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Estado de São Paulo: plantas associadas e parasitismo. *Neotrop. Entomol.* 38: 321-326.
- Matthews, R.W. 1974.** Biology of Braconidae. *Annu. Rev. Entomol.* 19: 15-32.
- Mochiah, M.B., A.J. Ngi-Song, W.A. Overholt & M. Botchey. 2003.** Variation in total and differential haemocyte count of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) parasitized by two biotypes of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) and larval growth responses. *Environ. Entomol.* 32: 247-255.

- Moreau, S.J.M., S. Vinchon, A. Cherqui & G. Prévost. 2009.** Components of *Asobara* venoms and their effects on hosts. *Adv. Insect Physiol.* 70: 217-232.
- Müller, G.C., A. Junnila, J. Butler, V.D. Kravchenko, E.E. Revay, R.W. Weiss, Y. Schlein. 2009.** Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J. Vector. Ecol.* 34: 2-8.
- Nakamatsu, Y., Y. Gytoku & T. Tanaka. 2001.** The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnvirus. *J. Insect Physiol.* 47: 573-584.
- Nakamatsu, Y. & T. Tanaka. 2003.** Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separate* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. *J. Insect Physiol.* 49: 149-159.
- Nash, W.J. & T. Chapman. 2014.** Effect of dietary components on larval life history characteristics in the Medfly (*Ceratitis capitata*: Diptera, Tephritidae). *PlosONE.* 9: e86029.
- Obonyo, M., F. Schulthess, J. Gerald, O. Wanyama, B. Le Ru & P.A. Calatayud. 2008.** Location, acceptance and suitability of lepidopteran stemborers feeding on a cultivated and wild host-plant to the endoparasitoid *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control* 45: 36-47.
- Omwega, C.O., S.W. Kimani, W.A. Overholt & C.K.P.O. Ogol. 1995.** Evidence of the establishment of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) in continental Africa. *Bull. Entomol. Res.* 85: 525-530.
- Ootani, A.A., R.W. Aguiar, A.C.C. Ramos, D.R. Brito, J.B. Silva & J.P. Cajazeira. 2013.** Use of essential oils in agriculture. *J. Biotec. Biodivers.* 4: 162-175.
- Palacios, S.M., A. Bertoni, Y. Rossi, R. Santander & A. Urzúa. 2009.** Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. *Molecules* 14: 1938-1947.
- Parkinson, N., C. Conyers & I. Smith. 2002a.** A venom protein from the endoparasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* is similar to snake venom reprolysin- type metalloproteases. *J. Invert. Pathol.* 79: 129-131.
- Parkinson, N., E. H. Richards, C. Conyers, I. Smith & J. P. Edwards. 2002b.** Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 729-735.
- Parra, J.R.P., P.S.M. Botelho, B.S. Côrrea-Ferreira & D.J.M. Bento. 2002.** Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores. São Paulo, Manole, 609p.
- Peydró, R.J., J.V.F. Garí, C.G. Martos & J.M. Marí. 1996.** Comparative morphology of the venom apparatus in some subfamilias of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Boln. Asoc. Esp. Entomol.* 20: 149-159.

- Poonpaiboonpipat, T., U. Pangnakorn, U. Suvunnamek, M. Teerarak, P. Charoenying & C. Laosinwattana. 2013.** Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Ind. Crops Prod.* 41: 403-407.
- Qamar, A. & K. Jamal. 2009.** Differential haemocyte counts of 5th instar nymphs and adults of *Dysdercus cingulatus* Fabr (Hemiptera: Pyrrhocoridae) treated with acephate, an organophosphorus insecticide. *Biol. Medic.* 1: 116-121.
- Ramalho, F.S., A.M.C. Silva J.C. Zanuncio & J.E. Serrão. 2007.** Competition Between *Catolaccus grandis* (Hymenoptera:Pteromalidae) and *Bracon vulgaris* (Hymenoptera:Braconidae), Parasitoids of the Boll Weevil. *Braz. Arch. Bio.Tec.* 50: 371-378.
- Ramalho, F.S., P.A. Wanderley, J.B. Malaquias, K.C.V. Rodrigues, J.V.S. Souza & J.C. Zanuncio. 2009a.** Temperature-dependent development rates of *Bracon vulgaris*, a parasitoid of boll weevil. *Phytoparasitica* 37: 17-25.
- Ramalho, F.S., P.A. Wanderley, J.B. Malaquias, J.V.S. Souza, K.C.V. Rodrigues & J.C. Zanuncio. 2009b.** Effect of temperature on the reproduction of *Bracon vulgaris* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the cotton boll weevil. *Entomol. News* 120: 476-487.
- Rivers, D.B., M.M. Rocco & A.R. Frayha. 2002.** Venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* increases Na⁺ influx and activates phospholipase C and phospholipase A2 dependent signal transduction pathways in cultured insect cells. *Toxicon* 40: 9-21.
- Rivers, D.B., F. Uçkan & E. Ergin. 2006.** Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 61: 24-41.
- Sarmiento-Brum, R.B.C., H.G. Castro, F.R. Gama, C.H. Cardon & G.R. Santos. 2014.** Phytotoxicity of essential oils in watermelon, bean and rice plants. *J. Biotec. Biodivers.* 5: 101-109.
- Schwartz, E.F., C.B.F. Mourão, K.G. Moreira, T.S. Camargos & M.R. Mortari. 2012.** Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides. *Pept Sci.* 98: 385- 405.
- Silva, G., A. Lagunes, J. Rodríguez & D. Rodríguez, D. 2002.** Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Man. Integ. Plag. Agroecol.* 66: 4-12.
- Siqueira, S.L.D. & M.H.L. Kruse. 2008.** Agrochemicals and human health: contributions of healthcare professionals. *Rev. Esc. Enferm. USP.* 42: 584-590.
- Stanley, D. & J.S. Miller. 2006.** Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119: 1-13.

- Toscano, L.C. & S.L. Carvalho. 2000.** Parasitismo em *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 por *Bracon vulgaris*, Ashmead em cultura de algodão sem medidas de controle na região de Ilha Solteira - SP. Braz. J. Ecol. 12: 123 -127.
- Vacari, A.M., G.S. Genovez, V.L. Laurentis & S.A. Bortoli. 2012.** Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* e seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. Bragantia, 71: 355-361.
- Zapata, N., P. Medina, M. Gonzalez, F. Budia, B. Rodríguez & E. Viñuela, E. 2004.** Toxicidad de azadirona y 1,7+ 3,7-di-O-acetilhavanensina (4:1) sobre adultos de *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hym.: Braconidae). Bol. Sanid. Veg. Plagas 30: 783-789
- Zikic, V., C.V. Achterberg, S.S. Stankovic & M. Ilic. 2011.** The male genitalia in the subfamily Agathidinae (Hymenoptera: Braconidae): morphological information above species on generic level. Zool. Anzeig. 250: 246 - 257.
- Wang, X., Z. Yang & J.R. Gould. 2010.** Sensilla on the antennae, legs and ovipositor of *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the emerald ash borer *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). Micros. Res. Technol. 73: 560-571
- Wood, W. & A. Jacinto. 2007.** *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. Nature Reviews: Mol. Cell Biol. 8: 542-551.
- Wu, M.L., G.Y. Ye, J.Y. Zhu, X.X. Chen & C. Hu. 2008.** Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*. J. Invert. Pathol. 99: 186–191.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA DOS ÓRGÃOS DE PRODUÇÃO, ESTOCAGEM E DISTRIBUIÇÃO DE TOXINA DO ECTOPARASITOIDE *Bracon vulgaris*

THIAGO J.S. ALVES ¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA ², ÁLVARO A.C. TEIXEIRA ², LUIZ
C. ALVES ³, BRENO C. ARAÚJO ⁴, EDUARDO M. BARROS ¹ E FRANKLIN M. CUNHA ¹

¹ Departamento de Agronomia - Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco
(UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife – PE, Brasil.

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
52171-900, Recife – PE, Brasil.

³ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Departamento de Parasitologia, Laboratório
de Biologia Celular e Molecular, 52171-011, Recife, PE, Brasil.

⁴ Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901,
Recife-PE, Brasil.

¹Alves, T.J.S., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, L.C. Alves, B.C. Araújo, E.M. Barros & F.M. Cunha. 2015. Morphological and histological characterization of production structures, storage and distribution of venom in the parasitic wasp *Bracon vulgaris*. *Toxicon* 108: 104-107.

RESUMO - Foram descritas a morfologia e composição histológica das estruturas relacionadas a produção, armazenamento e distribuição de veneno em *Bracon vulgaris*, uma vespa que parasita seus hospedeiros após a inoculação de uma peçonha que ocasiona uma paralisia irreversível. Foram encontrados 22 filamentos glandulares, revestidos por epitélio secretor, associados a um reservatório revestido internamente por quitina e externamente por uma musculatura estriada. Uma válvula media a passagem da toxina ao ducto de veneno rumo ao ovipositor dos parasitoides.

PALAVRAS-CHAVE: Braconidae, aparato de veneno, parasitoide, análises histológicas.

MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PRODUCTION
STRUCTURES, STORAGE AND DISTRIBUTION OF VENOM IN THE PARASITIC WASP

Bracon vulgaris

ABSTRACT – It was described the morphology and histological composition of the structures related to production, storage and distribution of *Bracon vulgaris* venom, a wasp that parasite their hosts after the inoculation of a venom which causes irreversible paralysis. Were found 22 glandular filaments, coated with secretory epithelium associated with a reservoir coated internally by a chitin layer and externally by striated muscular fibers. A valve mediates the passage of the toxin to venom duct towards the parasitoids sting.

KEY WORDS: Braconidae, venom apparatus; parasitoid; histological analysis.

Introdução

Toxinas de insetos atualmente são apontadas como potenciais moléculas para uso farmacológico (Moreau & Guillot 2005). Além disso, ao ser isolado e precisamente identificado, o veneno de um inseto pode servir de base para o desenvolvimento de inseticidas eficazes e seletivos, favorecendo programas de controle de pragas (Beckage & Gelman 2004). O veneno de vespas, por ser um múltiplo composto, pode acarretar diversos efeitos sobre o hospedeiro acometido, dentre eles, efeitos citolíticos e neurotóxicos (Ergin *et al.* 2006, Er *et al.*, 2011). Assim, a identificação das estruturas secretoras, o isolamento das toxinas e, posteriormente, suas proteínas majoritárias preditas, são de grande valia para compreensão dos efeitos resultantes da interação toxina/hospedeiro; a exemplo, Cunha *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2008) descreveram, respectivamente, a ação anticonvulsante e antitumoral de peptídeos isolados do veneno de vespas predadoras do gênero *Polybia*.

Bracon vulgaris Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) é uma vespa parasitoide cujas fêmeas adultas parasitam seus hospedeiros mediante inoculação de veneno, ainda não precisamente identificado, enquanto realizam a oviposição. A interação com o veneno leva o hospedeiro a uma paralisia irreversível, impedindo seu desenvolvimento e, posteriormente, ocasionando sua morte (Alves *et al.* 2014).

Assim, se presume que a toxina dessa vespa pode representar uma potencial e valiosa fonte no desenvolvimento de moléculas com atividade biológica para o controle de herbívoros, visto que, naturalmente, o parasitismo realizado por esta vespa ocasiona taxas iguais ou superiores a 57% de mortalidade (Toscano & Carvalho 2000). No entanto, para utilizar essa peçonha se faz necessário conhecermos previamente o aparato de veneno dessa espécie, para compreender como ocorre a produção, armazenamento e utilização da toxina por estas vespas parasitoides. Assim o

objetivo desta pesquisa foi avaliar e descrever a organização estrutural e a constituição histológica das estruturas envolvidas na secreção, estocagem e distribuição do veneno de *B. vulgaris*.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM, Recife-PE. Os insetos, por sua vez, foram obtidos através da emergência de adultos cujas formas larvais foram coletadas em cultivos de algodoeiro em Surubim-PE.

Para a análise morfológica do aparato de veneno de *B. vulgaris*, fêmeas adultas, (n=30), com 5 dias de idade, acasaladas, alimentadas e sem experiência de parasitismo, foram dissecadas, com o auxílio de pinças oftalmológicas, sob estereomicroscópio para avaliação da constituição e localização das estruturas que compõe o aparato de veneno dessa vespa parasitoide. As estruturas foram então fotografadas com Câmera iSight de 8MP, e a obtenção das medidas do comprimento e diâmetro foi realizada através do programa Image J V1.49p. Posteriormente, a porção contendo o reservatório de veneno, os filamentos glandulares e o ducto de veneno foram isolados e fixado em formol 10% por 24 horas e desidratado em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80 e 95%), por 10 minutos cada. Por fim, o material foi embebido em historesina e os cortes obtidos, 3 μ m, foram submetidos às técnicas de coloração pelo azul de Toluidina (coloração geral) e Xilidina ponceau (proteína total). A análise histológica foi realizada utilizando microscópio de luz, Leica DM 500, e as imagens obtidas através do programa LAS EZ Version 2.0.0 ICC50.

Resultados e Discussão

O aparato de veneno de *B. vulgaris* está localizado internamente na região posterior do abdômen das fêmeas adultas. Ele é formado por um reservatório de veneno de morfologia oval circundado por 22 filamentos glandulares alongados, em forma de tentáculos, desse reservatório parte um ducto que se comunica com ducto da glândula de Dufour os quais se anastomosam para formar o ducto de veneno, o qual desemboca no ovipositor (Fig. 1A). O reservatório de veneno apresentou as seguintes medidas 1,7 mm de comprimento e 0,9 mm de diâmetro, enquanto os filamentos glandulares mediam aproximadamente 2,5 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, variando de 3,2 a 1,4 mm em comprimento e 0,6 a 0,1 mm de diâmetro (Fig. 1B). Já a glândula de Dufour apresentou medidas de 4,2 mm de comprimento e 0,9 mm de diâmetro (Fig. 1C). De acordo com a literatura o reservatório é um órgão de estocagem e distribuição da toxina, enquanto que a glândula de Dufour está relacionada à marcação de hospedeiros já parasitados (Abdala & Cruz-Landim 2001), (Fig.1C).

A análise histológica revelou que o reservatório de veneno de *B. vulgaris* apresenta-se revestido internamente por uma íntima de quitina helicoidal e externamente por uma espessa camada de fibras musculares estriadas orientadas longitudinalmente, na região central da estrutura pode ser visualizado um lúmen, região de estocagem do veneno (Fig.2A e 2B). Os filamentos glandulares apresentam-se revestido por uma camada simples de epitélio secretor constituídos por células cúbicas, com núcleo esférico e central (Fig.2C). O produto secretado é então lançado no lúmen central através de vesículas densas (Fig.2C). O reservatório de veneno de *B. vulgaris* na sua porção final apresenta uma válvula de tecido muscular (Fig. 2D e 2E) que media a passagem da toxina, contida no reservatório, ao ducto de veneno (Fig. 2D), que por sua vez, também apresenta uma espessa camada muscular externamente.

A análise do aparato de veneno é de suma importância tanto para correlacionar o processo de produção da toxina com o comportamento de parasitismo da vespa: se causam paralisia temporária ou irreversível em seus hospedeiros e como os parasitam, se interna ou externamente (Barbalho & Pentead-Dias 1997, Quicke 1997); como também para elucidar os caminhos evolutivos seguidos por diferentes taxas, visto que a morfologia, inserção e disposição dos filamentos glandulares e do reservatório de veneno, por exemplo, são extremamente divergentes nesse grupo de insetos (Peydró *et al.* 1996, Barbalho & Pentead-Dias 1997; Vardal 2006, Moreau *et al.* 2009).

A avaliação histológica revelou se tratar de um aparato de veneno, de origem ectodérmica, do tipo I (Edson & Vinson 1979, Quicke 1997), onde a espessa camada externa de fibras musculares estriadas e a hélice quitinosa interna do reservatório de veneno funcionam em associação para permitir a passagem da toxina rumo ao ovipositor. A alta quantidade de filamentos glandulares observada em *B. vulgaris*, 22, pode representar uma vantagem evolutiva, o que justificaria o sucesso do parasitismo dessa espécie quando comparado a outras vespas que competem com esta por hospedeiro (Ramalho *et al.* 2009), presumivelmente, a quantidade de filamentos glandulares, bem como um reservatório de veneno com uma grande capacidade de estocagem, pode favorecer respostas paralisantes mais eficientes por apresentarem propriedade de síntese e/ou reposição do veneno com maior rapidez.

O tamanho corporal reduzido, geralmente apresentado pelas vespas parasitoides, constitui uma limitação para pesquisas focadas em avaliar a anatomia de seu aparato de veneno e, posteriormente, a aplicabilidade de sua toxina. *B. vulgaris*, por exemplo, mede cerca de 3,29 mm de comprimento e aproximadamente 0,00512 µg/mL de peptídeos tóxicos foram coletados em cada fêmea (dados não publicados). Esse obstáculo justifica a grande divergência encontrada quanto ao número de pesquisas realizadas com avaliações histológicas de estruturas secretoras de

veneno em outros animais produtores de peçonha de maiores dimensões (Taib & Jarrar 1993, Kovoov & Muñoz-Cuevas 2000, Jarrar & Al-Rowaily 2008, Antoniazzi *et al.* 2009, Dehghani *et al.* 2010, Giannotti *et al.* 2013).

A escassez de bases científicas sobre a morfo-histologia do aparato de veneno em vespas parasitoides desfavorece a descoberta de moléculas potenciais e inovadoras, já que toxinas, nesses himenópteros, constitui um mecanismo fisiológico desenvolvido ao longo do curso evolutivo para driblar as defesas imunológicas de seus insetos hospedeiros, apresentando assim, padrões de especialização para imobilização e ou mortalidade destes (Beckage & Gelman 2004, Moreau *et al.* 2009). Além disso, a falta de conhecimento acerca da constituição histológica das células secretoras de veneno e sua correta localização pode acarretar danos mecânicos as estruturas quando manuseadas incorretamente, como propõem Giannotti *et al.* (2013), se fazendo necessário, por tanto, necessário conhecer previamente a organização estrutural e composição do aparato de veneno no organismo estudado.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pela bolsa concedida ao primeiro autor, ao Dr. Bruno Fiorelini por apoiar o desenvolvimento deste estudo, assim como ao Emerson Barbosa e a Gabriela Teixeira pela representação gráfica do aparato de veneno de *B. vulgaris*.

Literatura Citada

Abdalla, F.C. & C. Cruz-Landim. 2001. Dufour glands in the hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review. *Rev. Bras. Biol.* 61: 95-106.

- Alves, T.J.S., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, C.S.A. Silva-Torres, J.B. Malaquias, B.F. Pereira & F.M. Cunha. 2014.** Parasitoid-host interaction: sensory structures involved in the parasitism behavior of *Bracon vulgaris* (Hymenoptera: Braconidae). *Anim. Biol.* 64: 365-381.
- Antoniuzzi, M.M., C.M. Pedroso, I. Knysak, R. Martins, S.P.G. Guizze, C. Jared & K.C. Barbaro. 2009.** Comparative morphological study of the venom glands of the centipede *Cryptops iheringi*, *Otostigmus pradoi* and *Scolopendra viridicornis*. *Toxicon* 53: 367-374.
- Barbalho, S.M. & A.M. Penteado-Dias. 1997.** Análise morfológica do aparelho de veneno nos Braconidae cyclostome (Hymenoptera). *Rev. Bras. Zool.* 14: 65-71.
- Beckage, N.E. & D.B. Gelman. 2004.** Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 299-330.
- Cunha, A.O.S., M.R. Mortari, L. Oliveira, R.O.G. Carolino, J. Coutinho-Netto, & W.F. Santos. 2005.** Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp. Biochem. Physiol.* 141: 50-57.
- Dehghani, H., M.M. Sajjadi, P. Parto, H. Rajaian & A. Mokhlesi. 2010.** Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. *Toxicon.* 55: 1188-1194.
- Edson, K.M. & S.B. Vinson. 1979.** A comparative morphology of the venom apparatus of female braconids (Hymenoptera: Braconidae). *Can. Entomol.* 111: 1013-1024.
- Er, A., F. Uçkan, D.B. Rivers & O. Sak. 2011.** Cytotoxic effects of parasitism and application of venom from the endoparasitoid *Pimpla turionellae* on hemocytes of the host *Galleria mellonella*. *J. Appl. Entomol.* 135: 225-236.
- Ergin, E., F. Uçkan, D.B. Rivers & O. Sak. 2006.** In vivo and in vitro activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Arch. Insect Bioch. Physiol.* 61: 87-97.
- Giannotti, K.C., A. Sesso, K.F. Grego, W. Fernandes, R.P. Cardoso-Júnior, G.G. Camargo & S.M. Carneiro. 2013.** Viperid venom glands with defective venom production. Morphological study. *Toxicon* 70: 32-3.
- Jarrar, B.M. & M.A. Al-Rowaily. 2008.** Histology and histochemistry of the venom apparatus of the black scorpion *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) (Scorpiones: Buthidae). *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14: 514-526.
- Kovoor, J. & A. Muñoz-Cuevas. 2000.** Comparative histology of the venom glands in a Lycosid and several Oxyopid spiders (Araneae). *Ekológica* 19: 129-140.

- Moreau, S.J.M. & S. Guillot. 2005.** Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1209-1223.
- Moreau, S.J.M., S. Vinchon, A. Cherqui & G. Prévost. 2009.** Components of *Asobara* venoms and their effects on hosts. *Adv. Insect Physiol.* 70: 217-232.
- Peydró, R.J., J.V.F. Garí, C.G. Martos & J.M. Marí. 1996.** Comparative morphology of the venom apparatus in some subfamilies of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Bol. Asoc. Esp. Entomol.* 20: 149-159.
- Quicke, D.L.J. 1997.** Parasitic Wasp. Cambridge, Chapman & Hall, 470.
- Ramalho, F.S., Wanderley, P.A., Malaquias, J.B., Souza, J.V.S., Rodrigues, K.C.V., Zanuncio & J.C. 2009.** Effect of temperature on the reproduction of *Bracon vulgaris*, Ashmead (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the cotton boll weevil. *Entomol. News* 120: 476-487.
- Taib, N.T. & B.M. Jarrar. 1993.** Histological and histochemical characterization of the venom apparatus of Palestine yellow scorpion, *Leiurus quinquestriatus* Hemprich & Ehrenberg 1828. *Trop. Zool.* 6: 143-152.
- Toscano, L.C. & S.L. Carvalho. 2000.** Parasitismo em *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 por *Bracon vulgaris*, Ashmead em cultura de algodão sem medidas de controle na região de Ilha solteira – SP. *Braz. J. Ecol.* 12: 123-127.
- Vardal, H. 2006.** Venom gland and reservoir morphology in cynipoid wasps. *Arthrop. Struct. Develop.* 35: 127-136.
- Wang, K.R., B.K. Zhang, W. Zhang, J. Li & R. Wang. 2008.** Antitumor effects, cell selectivity and structure–activity relationship of a novel antimicrobial peptide *Polybia*-MPI. *Peptides* 29: 963-968.

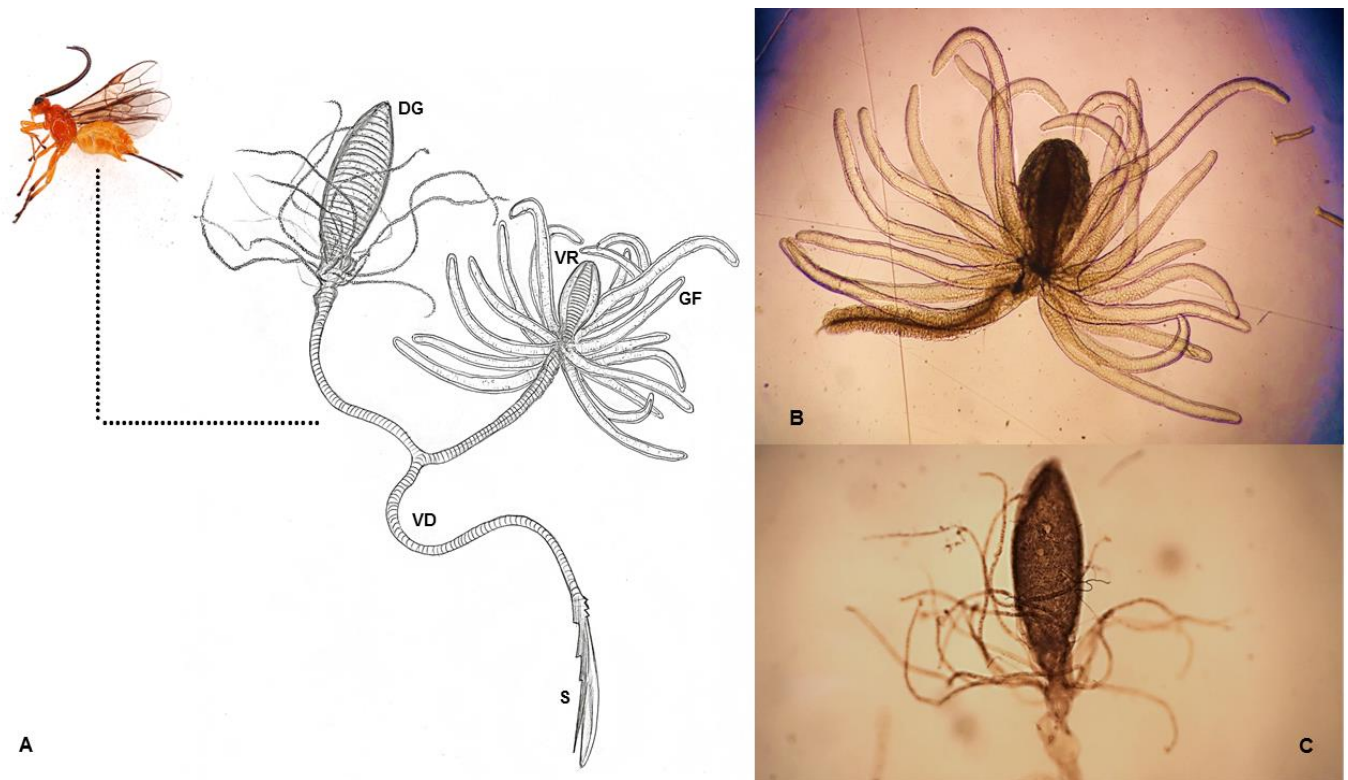


Figura 1. Anatomia do aparato de veneno de *B. vulgaris*. **A.** Representação esquemática do aparato de veneno. **B.** Reservatório de veneno (RV) - 1,7 mm x 0,9 mm; e Filamentos Glandulares (FG) \cong 2,5 mm x 0,5 mm. **C.** Glândula de Dufour (GD) - 4,2 mm x 0,9 mm. DV = Ducto de veneno e OV = ovipositor.

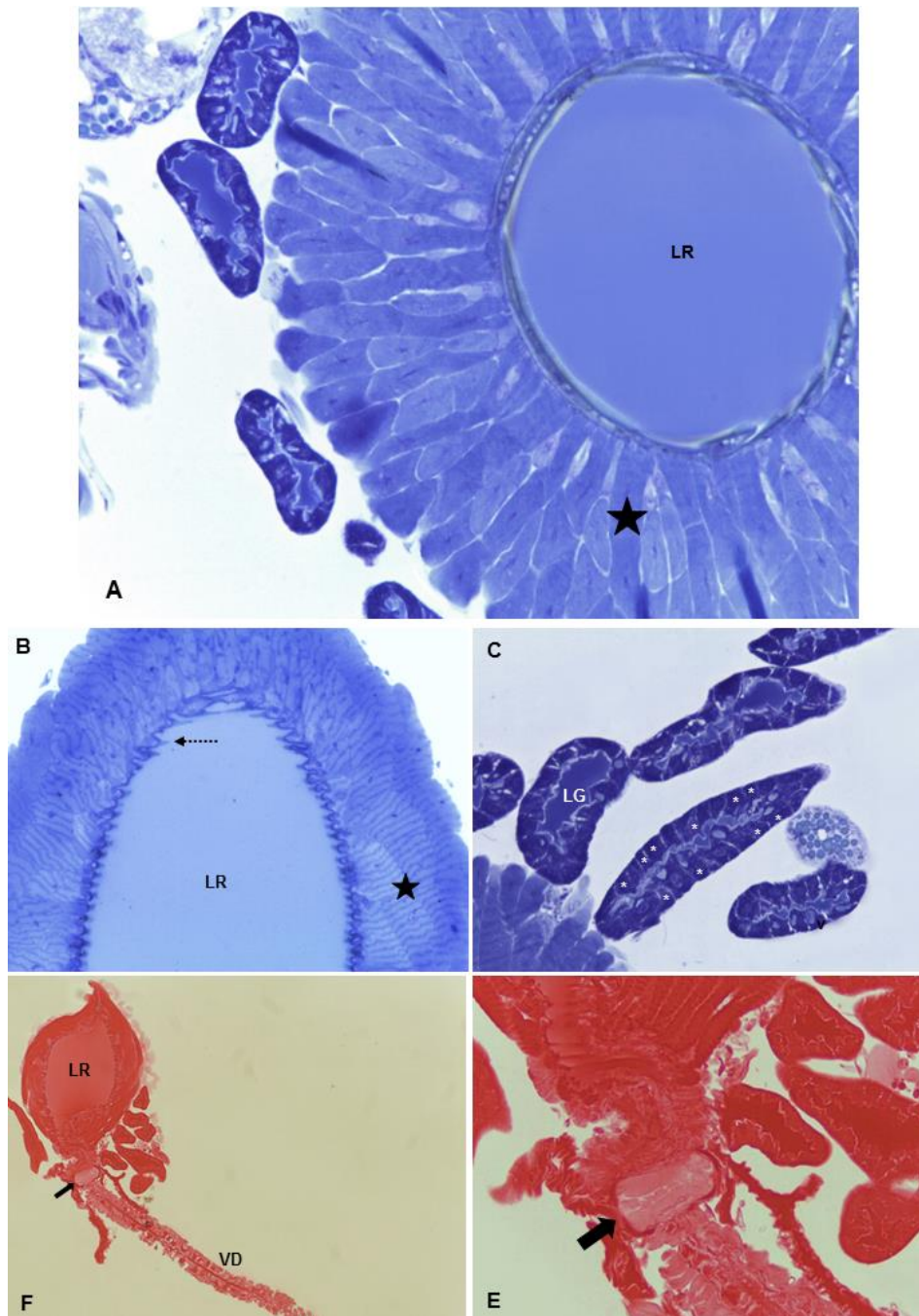


Figura 2. Histologia das estruturas de produção, estocagem e distribuição de toxina na vespa parasitoide *Bracon vulgaris*. **A.** Disposição geral dos filamentos glandulares em torno do reservatório de veneno. Azul de toluidina, 100 μ m. **B.** Filamentos glandulares. Epitélio secretor (asterisco) disposto de modo a circular todo o filamento glandular, o produto secretado é então lançado no lúmen central (L_r). Presença de vacúolos (cabeça de seta). Azul de toluidina, 20 μ m. **C.** Reservatório de veneno. Revestido internamente por uma íntima de quitina helicoidal (seta tracejada). L_r - Lúmen do reservatório, estrela - Fibras musculares externas. Azul de toluidina, 20 μ m. **D.** Válvula de tecido muscular (seta) media a passagem da toxina, contida no lúmen do reservatório (L_r) ao ducto de veneno (DV). Xilidina ponceau, 100 μ m. **E.** Destaque da válvula muscular (seta). Xilidina ponceau, 20 μ m.

CAPÍTULO 3

COMPOSIÇÃO E TOXICIDADE DE *Triunvirato*: UMA MISTURA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA A MOSCA DAS FRUTAS, *Ceratitis Capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA:
TEPHRITIDAE)

THIAGO J.S. ALVES¹, ANA MURCIA², ANDREA WANUMEN², VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA^{1,3},
ÁLVARO A.C. TEIXEIRA³, ANTONIO ORTIZ⁴, PILAR MEDINA²

¹Laboratório de Histofisiologia de Insetos - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
52171-900 Recife, PE, Brasil.

²Unidad de Protección de Cultivos. Departamento de Producción Agraria. Escuela Técnica
Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de
Madrid (UPM). 28040. Madrid, España.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de
Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

⁴Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, EPSL, Universidad de Jaén, Linares (Jaén),
España.

¹Alves, T.J.S., A. Murcia, A.Wanumen, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C Teixeira, A. Ortiz, & P. Medina. Composition and toxicity of a mixture of essential oils against Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae).
Submetido ao Journal of Economic Entomology.

RESUMO - Triunvirato, um inseticida natural desenvolvido por nossa equipe a partir da mistura de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica* e *Corymbia citriodora*, expressou elevada mortalidade (DL50 = 0.018µL/inseto) sobre a mosca-das-frutas-do-mediterrâneo, *Medfly*, (Diptera: Tephritidae), uma praga agrícola de importância global já registrada infestando mais de 350 hospedeiros vegetais. A caracterização química do produto, analisada através de cromatografia de massa (GC-MS), demonstrou que diversos constituintes identificados em Triunvirato já são conhecidos por suas propriedades inseticidas ou insetistática sobre espécies pragas. Os testes de fitotoxicidade, por sua vez, revelaram que esse produto natural é inócuo para a planta hospedeira onde a interação inseto/praga é desenvolvida. Triunvirato também se apresentou compatível com o controle biológico realizado pelo parasitoide *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), não afetando a sobrevivência e nem a capacidade benéfica dessa vespa parasitoide responsável pela redução de populações de tefritídeos, sendo por tanto classificado como categoria 1 na escala IOLB. De acordo com os nossos resultados Triunvirato é uma proposta ecológica e promissora ao manejo de *Medfly*, embora seu preço de produção não seja competitivo com os inseticidas sintéticos comerciais; assim, abordamos e discutimos as vantagens e impasses relacionados a utilização desse inseticida natural.

PALAVRAS-CHAVE: Biopesticida, *Medfly*, *Psytalia concolor*, LD50, GC-MS, fitotoxicidade

COMPOSITION AND TOXIC OF TRIUNVIRATO: A MIXTURE OF ESSENTIAL OILS
AGAINST MEDITERRANEAN FRUIT FLY, *CERATITIS CAPITATA* (WIEDEMANN)
(DIPTERA: TEPHRITIDAE)

ABSTRACT – We present a proposal of natural insecticide developed from the mixture of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae), *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière (Pinaceae) and *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Myrtaceae). The mixture of oils caused high mortality ($LD_{50} = 0.018 \mu\text{L}/\text{insect}$) to the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), a globally important pest, after topical application. Based on the chemical characterization of biopesticide using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis, many of the constituents had known insecticidal properties (the monoterpenes α -citronellal and *E*-citral and the sesquiterpenes α -himachalene and β -himachalene, all at concentrations above 15%). Phytotoxicity tests on oranges demonstrated that this natural product was harmless when the mixture was applied diluted in water with a surfactant. The mixture of essential oils was also harmless (1, IOBC category) to the biological control agent responsible for reducing populations of tephritids, the parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), following exposure to treated orange trees in a semi-field assay within a greenhouse. Our results suggest that mixture of Eos has potential for use as a biocide against medfly, although the production price was exceedingly high compared with that of commercial synthetic insecticides. Therefore, we discuss the advantages and disadvantages related to the potential use of this natural insecticide.

KEY WORDS: biopesticide, medfly, *Psytalia concolor*, LD_{50} , GC-MS, phytotoxicity.

Introdução

A utilização de biopesticidas tem sido impulsionada pela ampliação dos cultivos orgânicos, sobretudo devido às exigências de consumidores que buscam uma produção sustentável e livre de resíduos agroquímicos (Isman 2008, Regnault-Roger *et al.* 2012). O conhecimento acerca dos efeitos deletérios relacionados às intoxicações provocadas por inseticidas, somado a insatisfação pertinente à contaminação ambiental e alimentar, fomentaram a busca por métodos alternativos de controle de pragas que fossem ecologicamente viáveis (Siqueira & Kruse 2008, Ootani *et al.* 2013). Dentre estas alternativas, destacaram-se os óleos essenciais, substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas e que podem apresentar atividade inseticida (*Bakkali et al.* 2008).

Óleos essenciais são substâncias de defesa oriundas do metabolismo secundário de plantas e que, devido a sua complexa composição, podem atuar em diversos sítios de ação nos insetos, induzindo respostas biológicas (mortalidade e inanição) (Amer & Mehlhorn 2006, Koul *et al.* 2008, Palacios *et al.* 2009), comportamentais (repelência, dissuasão e inibição da oviposição) (Müller *et al.* 2009, Brari & Thakur 2016) e fisiológicas (regulação do crescimento e alterações morfo-histológicas) (Hummelbrunner & Isman 2001, Alves *et al.* 2014, Cruz *et al.* 2015). Apesar de existirem mais de 3.000 toxinas botânicas já identificadas, nos últimos 30 anos, poucos produtos à base dessas substâncias naturais foram formulados, registrados e comercializados com êxito (Tripathi *et al.* 2009, Isman 2008).

Entre os impasses relacionados à utilização de um biopesticida, apontado como promissor, se faz necessário avaliar se este poderia ser aplicado sem gerar efeitos indesejados, tais como danos a planta hospedeira ou ao controle biológico realizado naturalmente pelos predadores e parasitoides da praga, já que alguns inseticidas, mesmo que de origem natural, são capazes de exercer efeitos fitotóxicos (Poonpaiboonpipat *et al.* 2013, Sarmiento-Brum *et al.* 2014) e também

interagir com os inimigos naturais devido a liberação de moléculas odoríferas (voláteis), que se ligam a proteínas olfativas de recepção presentes nas antenas e palpos maxilares destes insetos, podendo atraí-los ou causar lhes repelência (Maia & Moore 2011).

Assim, o objetivo desta investigação foi avaliar a toxicidade de Triunvirato, um inseticida natural desenvolvido por nossa equipe a partir da mistura de óleos essenciais, sobre a mosca-das-frutas-do-mediterrâneo (Medfly), *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), e a interferência deste produto biológico sobre a capacidade benéfica do parasitoide *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), um inimigo natural responsável pela redução de populações de Tefritídeos, dentre elas Medfly (Adán *et al.* 2007, Bengochea *et al.* 2014). Por fim, avaliamos a composição química de Triunvirato e se este bioinseticida possuía propriedades fitotóxicas sobre a planta onde a interação *P. concolor*/Medfly é desenvolvida.

Material e Métodos

Insetos. Os insetos foram obtidos da criação estoque do Departamento de Proteção de Cultivos, da Universidad Politécnica de Madrid, onde os adultos de *C. capitata* foram mantidos em gaiolas retangulares de metacrilato (50 x 40 x 40 cm) com bebedouro (250 mL), sendo alimentados com uma dieta a base de proteína hidrolisada de soja e açúcar na proporção 1:4, respectivamente. As gaiolas, por sua vez, estavam acondicionadas em câmara climatizadas a temperatura de 25 ± 2 °C, 74 ± 5 % de umidade relativa e fotoperíodo de 16 h de luz. Sob estas mesmas condições, o parasitoide *P. concolor* foi criado seguindo a metodologia desenvolvida por Jacas & Viñuela (1994), tendo larvas de *C. capitata* como hospedeiro e alimentados com uma mistura de levedura seca de cerveja e açúcar moído, na proporção de 4:1, e mantidos em câmara climatizada sobre as mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo.

Óleos Essenciais e Seleção de Triunvirato. Os óleos essenciais de Capim limão (*Cymbopogon citratus*, Poaceae), Cedro (*Cedrus atlantica*, Pinaceae), Eucalipto (*Corymbia citriodora*, Myrtaceae), Gerânio (*Pelargonium graveolens*, Geraniaceae) e Sândalo (*Amyris balsamífera*, Rutaceae); produzidos e distribuídos por Arte dos aromas I.C. LDTA, foram obtidos em lojas de especiarias na região metropolitana do Recife-PE, Brasil. Para determinação da toxicidade dos óleos essenciais sobre *C. capitata*, 80 insetos adultos, 40 machos (0,00466 g) e 40 fêmeas (0,00498 g) com idade de 24 horas depois de emergidos, foram utilizados para cada uma das doses em cada tratamento, sendo estas: 0,5, 0,25, 0,1, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 e 0.005 μL de óleo essencial/inseto, diluídos em acetona. Assim, cada inseto recebeu, através de aplicações tópicas com micropipetas eletrônicas de alto rendimento (Pipet4[®]u Revolution), 1 μL de solução na sua região protoráxica. O grupo controle recebeu apenas acetona (1 μL).

Depois das aplicações tópicas, os insetos foram acondicionados em recipientes plásticos de 12 cm x 5 cm (diâmetro x altura) com tampa ventilada, alimentados e mantidos em câmara climatizada (25 °C \pm 2 °C, UR: 74 \pm 5% e fotoperíodo 16 h de luz: 8 h escuro). Posteriormente, depois de avaliar a toxicidade dos óleos essenciais isolados, foram avaliadas, na proporção de 1:1:1, as seguintes misturas de óleos: *I*- Sândalo + Capim limão + Cedro; *II*- Gerânio + Eucalipto + Sândalo e *III*- Capim limão + Cedro + Eucalipto nas mesmas condições ambientais e metodológicas. A mortalidade foi avaliada com 24, 48 e 72 horas depois da aplicação tópica e o critério de mortalidade, foi baseado na ausência de mobilidade dos insetos após serem tocados com um pincel de cerdas suaves. Os dados da mortalidade foram submetidos ao programa POLO-Plus, desta maneira foram calculadas as doses letais 50 (DL50). De acordo com os resultados encontrados, selecionamos a mistura de óleos essenciais que representa nosso bioinseticida Triunvirato.

Ensaio de Laboratório. *Caracterização Química de Triunvirato e de Seus Óleos Essenciais Constituintes.* Os constituintes dos óleos essenciais de Cedro, Eucalipto, Capim limão e *Triunvirato* foram analisados através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). A análise CG-EM foi conduzida usando um Espectrômetro de Massa quádruplo Thermo QP-5000 acoplado a um Cromatógrafo Gasoso Thermo modelo FOCUS equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 mm × 0,25 mm × 0,25 µm de espessura; J & W Scientific, CA, USA). A temperatura foi programada a 60 °C por 5 min com aumento de 5 °C/min até 280 °C. Foi injetada a alíquota de 1 µL de volume do óleo diluído em Hexano. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C, tendo o Hélio como gás carreador, em fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹. A transferência para a Espectrometria de Massa (EM) foi realizada a 280 °C, já a EM quádruplo e a fonte de temperatura da EM foram 150 °C e 200 °C, respectivamente. A espectrometria de massa por impacto eletrônico foi conduzida com a energia de ionização estabelecida em 70 eV e a temperatura da fonte de íons e interface foi 200 °C, estando o intervalo de varredura entre 40 e 450 u. O programa utilizado foi o Xcalibur (Thermo Fisher). Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados em comparação com o Índice de Retenção (IR), calculado em relação ao tempo de retenção de uma série de alcanos lineares C8–C24 (Supelco Analytical, Bellefonte PA, USA) sob condições com temperatura própria, coinjeção padronizadas e por comparação dos dados de espectro de massa com Wiley 275L e biblioteca NIST.

Avaliação da Fitotoxicidade de Triunvirato. Para avaliar uma possível atividade fitotóxica do *Triunvirato*, foram selecionadas as doses letais capazes de causar 50 e 90% da mortalidade para machos e fêmeas de *C. capitata*, 0,018 e 0,048 µL/inseto, respectivamente. Assim, o bioensaio foi composto por 3 grupos: *tratamento a 0.018* (1,8 mL de Triunvirato + 1,5 mL de Tween 80 + 96,7 mL de água destilada), *tratamento a 0.048* (4,8 mL de Triunvirato + 1,5 mL de Tween 80 + 93,7 mL de água destilada) e *controle* (1,5 mL de Tween 80 + 98,5 mL de água destilada). Para o

preparo das soluções, Triunvirato foi adicionado em recipientes de vidro (200 mL) e em seguida o agente dispersante, Tween 80 a 1,5 %; por fim foram acrescentadas as respectivas quantidades de água destilada e os recipientes levados ao agitador ultrassônico para promover a mescla dos componentes. Posteriormente, 10 folhas com cerca de 4,4 cm x 11 cm, obtidos de laranjeiras variedade Navelina com 16 meses de idade, foram pulverizadas com aplicadores manuais de 100 mL até o ponto de gotejamento, com cada solução correspondente ao seu grupo e depositadas para secar em temperatura ambiente.

Um segundo estudo foi realizado para avaliar se a acetona, utilizada nos ensaios de laboratório para veicular a utilização de Triunvirato, seria capaz de danificar o vegetal, foram estabelecidos os grupos: *0,018/acetona* (1,8 µL de Triunvirato + 98,2 µL de acetona), *0,048/acetona* (4.8 mL de Triunvirato + 95,2 µL de acetona) e *Testigo/acetona* (apenas acetona). Após 24 e 48 horas das aplicações, foram realizadas avaliações utilizando a escala de fitotoxicidade indicada por Sarmento-Brum *et al.* (2014): 0% = ausência de fitotoxicidade, 1 a 25% = clorose a início de necrose, 26 a 50% = necrose em algumas áreas, 51 a 75% = acentuada necrose em várias zonas foliares e 76 a 100% = murcha total.

Ensaio de Semicampo. Em casas de vegetação, se aplicou sobre laranjeiras, variedade Navelina com 16 meses e 60 cm de altura, os tratamentos: Triunvirato (DL 90 = 0,048µL), controle negativo (água + Tween 80 a 1,5 %) e como controle positivo, Karate Zeon + 1,5 CS[®] (Syngenta) na dose registrada para o controle de *C. capitata* em cultivos de cítricos (0,065-0,13 %) (Magrama). Depois de pulverização manual até o ponto de gotejamento e tão pronto estivessem secas, cada laranjeira, considerado uma unidade experimental (n=4), foi introduzida em uma gaiola (60 cm de altura x 25 de largura x 25 de comprimento) cuja duas bases são de madeira, enquanto que três faces são de tela de voil, uma delas apresentava uma malha tecidual pela qual se introduziram os insetos, a quarta face da gaiola era de metacrilato e apresentava a transparência

necessária para visualizar os insetos. Por fim, foram liberados 20 adultos de *C. capitata* com 24 horas de idade, 10 machos (0,00483 g) e 10 fêmeas (0,00485 g), juntamente com 10 adultos de *P. concolor*, 5 machos (0,0019 g) e 5 fêmeas (0,0022 g), em cada gaiola, onde foram disponibilizados bebedores e recipientes com alimento para *Medfly* (soja hidrolisada + açúcar) e *P.concolor* (levedura seca de cerveja + açúcar moído). Foram avaliadas a sobrevivência desses insetos durante 24, 48 e 72 horas após exposição às laranjeiras tratadas.

Análises Estatísticas. Os dados obtidos nos diferentes bioensaios foram analisados estatisticamente utilizando o aplicativo informático Statgraphics versión Centuriun® (STSC, 1987) e SPSS Statistics® (IBM, 2013). Para comparar os efeitos de cada tratamento, se utilizou o teste F de análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). Posteriormente se realizou o teste de mínimas diferenças significativas (LSD), o qual separa a média dos dados em grupos homogêneos, facilitando a comparação entre os tratamentos.

Segundo o parâmetro a avaliar se utilizou uma análise de variância para comparar a média entre os fatores. No caso do ensaio de semicampo se utilizou uma Anova de uma via para cada espécie e sexo, em cada momento da avaliação de mortalidade (24 h, 48 h e 72 h), da mesma maneira que uma Anova de três vias, cujos fatores foram espécie, tratamento e sexo dos indivíduos, também para o efeito de mortalidade segundo cada momento da avaliação. No caso do ensaio da seleção de Triunvirato foram avaliados os efeitos dos óleos essenciais de forma individual e com 3 misturas para a mortalidade. Em ambos os casos, se utilizaram Anova de três vias, cujos fatores foram tratamento, dose e sexo dos indivíduos.

Categorias OILB. Para classificar os produtos segundo as categorias de toxicidade da OILB, se calculou o incremento da mortalidade acumulada as 72 h, com respeito ao grupo controle, mediante a equação de Schneider-Orelli (Püntener, 1981):

$$M(\%) = \frac{M_{\text{tratado}} - M_{\text{control}}}{100 - M_{\text{control}}} \times 100$$

As categorias utilizadas foram as de condições de semicampo, sendo: 1 = inócuo (<25 %), 2= ligeiramente tóxico (25-50 %), 3= moderadamente tóxico (51-75 %) e 4= tóxico (> 75%) (Hassan, 1994, Sterk et al. 1999).

Resultados e Discussão

Toxicidade dos Óleos Essenciais sobre *Ceratitis capitata* e Seleção de Triunvirato. Os óleos essenciais avaliados, depois de 72 horas, apresentaram uma expressiva atividade inseticida sobre adultos de *C. capitata*, com doses letais 50 % que variaram de 0,012 a 0,032 µL/inseto para machos e 0,015 a 0,033 µL/inseto para fêmeas (Tabela 1). O óleo essencial de Cedro foi o mais tóxico tanto para os machos como para as fêmeas, seguido por Capim limão e Sândalo, enquanto o óleo essencial de Eucalipto, o de menor toxicidade (Tabela 1). De acordo com as doses letais encontradas, foram estabelecidas 3 misturas: *I* - **SC_{LC}**, composta pelos óleos essenciais que apresentaram as maiores toxicidades: Sândalo, Capim limão e Cedro; *II* - **GES**, formada pelos óleos que registraram as mais baixas toxicidades (Gerânio, Eucalipto e Sândalo) e *III* - **CECL**, composta pelos dois óleos essenciais mais tóxicos, Cedro e Capim limão, juntamente com o óleo de menor toxicidade, Eucalipto.

O nome *Triunvirato* foi inspirado na comparação da aliança entre três imperadores romanos que buscaram combater o progresso da resistência de um potencial inimigo. Sua seleção foi baseada de acordo com a relação custo/eficiência das misturas avaliadas (preço para a produção de 30 mL do produto/ DL₅₀), assim que, a mistura **CECL** (18€) foi determinada como o nosso bioinseticida Triunvirato e utilizada nos ensaios posteriores já que ela apresentou a mesma dose letal 50 % para as fêmeas de *C. capitata* que **SC_{LC}** (26€) e foi mais eficiente que **GES** (33,25€)

para este mesmo grupo de insetos, de modo que 0,018 μL de CEC_L seriam necessários para matar 50 % de todos os adultos, independente do sexo, visto que as fêmeas exibiram DL_{50} mais elevadas que os machos (Tabela 2). Quando comparado seu rendimento com a mortalidade encontrada nas avaliações com os óleos isolados, também sobre as fêmeas adultas de *Medfly*, *Triunvirato* demonstrou DL_{50} mais tóxica que 4 dos 5 óleos essenciais avaliados (Tabela 1).

Silva et al. (2002) afirmam que, em geral, os produtos de origem botânica exibem um efeito mais insetistático que inseticida, ou seja, inibem o comportamento alimentar, a oviposição, ou o crescimento dos insetos ao invés de matá-lo diretamente por suas propriedades tóxicas. No entanto, a interação de *C. capitata* com os 5 óleos essenciais avaliados resultou considerável taxas de mortalidade. Através de aplicação tópica foi possível avaliar o efeito direto da toxicidade de produtos de origem botânica sobre a praga, diferente dos ensaios de ingestão, que apresentam como sítio de ação, primordialmente, o trato digestivo dos insetos e que são largamente utilizados em análises inseticidas com óleos essenciais sobre *Medfly* (Moretti et al. 1998, Passino et al. 1999, Clemente et al. 2008, Papachristos et al. 2009, Miguel et al. 2010), a aplicação tópica é uma metodologia cujos dados resultantes da sua interação com esta praga são escassos (López et al. 2011) e que pode representar uma nova estratégia para o manejo de baixo risco de *C. capitata*.

A toxicidade do bioinseticida indica que *Triunvirato* é uma alternativa ecológica promissora ao controle de *C. capitata*, pois doses baixas do produto foram suficientes para causar elevada mortalidade dos adultos da praga quando comparadas a outros inseticidas botânicos também avaliados através de ensaios de aplicação tópica sobre *Medfly*, por exemplo, Benelli et al. (2012) determinaram DL_{50} de 0,047, 0,066 e 0,024 $\mu\text{L}/\text{mosca}$ para os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*, *Hyptis suaveolens* e *Thuja occidentalis* (*Triunvirato* = 0,017 $\mu\text{L}/\text{macho}$ e 0,018 $\mu\text{L}/\text{fêmea}$); López et al. (2011) informaram DL_{50} de 18,32, 14,50 e 19,97 $\mu\text{L}/\text{g}$, respectivamente, para os óleos essenciais de *Tagetes minuta*, *T. rupestris* e *T. terniflora* sobre machos adultos,

enquanto Triunvirato apenas 4,5 $\mu\text{L/g}$ (quantidade inseticida em μL /peso do macho). Quando comparado a outras espécies de dípteros, Triunvirato também se demonstrou eficiente e promissor, por exemplo, Pavela (2008), utilizando a mesma metodologia sobre *Musca domestica*, avaliou 35 óleos essenciais, dos quais 34 apresentaram DL_{50} maiores que Triunvirato.

A utilização de uma mistura ao invés de um só óleo, de acordo com Isman (1997), interfere no desenvolvimento da resistência pela praga, já que é muito mais difícil para um inseto conseguir destoxificar um complexo de substâncias que apenas um ou poucos componentes, além disso, uma mistura pode apresentar mais de um modo de atividade e múltiplos sítios de ação, atuando sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais. Possivelmente, Triunvirato foi capaz de causar a morte de *C. capitata* por se impor sobre as barreiras estruturais e químicas do tegumento, além disso, é possível especular também que o bioinseticida venceu defesas celulares e humorais, já que, segundo Marmaras *et al.* (1993), *Medfly* possui um mecanismo proteico de defesa em sua cutícula capaz de reconhecer e eliminar corpos invasores, enquanto Silva (2002) afirma que nos insetos, os hemócitos participam da eliminação de toxinas e, como testifica esta mesma autora, o sistema imunológico dos insetos não é específico e desenvolve uma mesma reação de defesa ao reconhecer a presença de uma substância ou organismos invasores, assim que, presumivelmente, o bioinseticida *Triunvirato* foi capaz de vencer estas duas linhas de defesa na praga.

Medfly é uma praga agrícola de importância global que resulta, anualmente, duplos prejuízos econômicos tanto com a perda financeira investida em seu controle, como também prejuízos resultantes da invalidação comercial dos frutos danificados por este inseto muito polífago, já registrado infestando mais de 350 hospedeiros (Nash & Chapman 2014). Assim, qualquer alternativa que se apresente como promissora ao controle de *C. capitata* deveria ser valorizada e avaliada para o manejo desta praga, pois, como afirmam Couso-Ferrer *et al.* (2011) e Arouri *et al.* (2014) já foram identificadas populações de *Medfly* resistentes a inseticidas, até o

momento, recomendados para seu controle, como Lambda-cyhalothrin, Fosmet, Methylchlorpyrifos, Deltamethrin e Spinosad, o que limita ainda mais o número de inseticidas indicados eficazmente para o controle desta praga. Logo, *Triunvirato* se apresenta como uma ferramenta ecológica na atual “corrida armamentista” contra *Medfly*, devido a sua natureza distinta.

Caracterização Química dos Produtos Botânicos e Avaliação da Fitotoxicidade de Triunvirato. As análises químicas foram realizadas em triplicata e, ao final, 97 % de Triunvirato foi identificado, dos quais β -himachalene foi o componente majoritário, com 18,32 %, seguido por α -himachalene (14,21 %), α -citronellal (18,09 %) e *E*-citral (15,05%) (Tabela 3). O óleo essencial de *C. citratus* apresentou como componentes principais os terpenóides *E*-citral e *Z*-citral, respectivamente 52,84 e 28,5%. Em contrapartida, *C. atlantica* foi caracterizado pela presença do sesquiterpeno β -himachalene (59,25%), enquanto o óleo essencial de *C. citriodora* apresentou 66,48% de Citronellal na sua composição (Tabela 3).

Quanto as propriedades fitotóxicas, os resultados demonstraram que nas doses utilizadas, 0,018 e 0,048 μ L, com ambos os métodos de dispersão (água e acetona), Triunvirato não mostrou efeitos fitotóxicos, de maneira que nenhum dano foi verificado depois de 48 horas de avaliação (Fig. 1), assim que, de acordo com a escala de fitotoxicidade proposta por Sarmiento-Brum *et al.* (2014), o produto foi classificado como inócuo quando avaliado sobre laranjeiras.

Alguns dos óleos essenciais que constituem Triunvirato já foram descritos, isoladamente, apresentando atividade fitotóxica através de danos morfológicos e bioquímicos a outras espécies vegetais, causando lhes: inibição da germinação, interferindo nas quantidades de clorofila e carotenoides, desenvolvendo necrose e murcha (Singh *et al.* 2005, Batish *et al.* 2008, Poonpaiboonpipat *et al.* 2013); No entanto, em nossos ensaios, mesmo utilizando uma mistura de óleos essenciais, o que poderia potencializar as propriedades tóxicas contra a planta, não foi verificado nenhum efeito similar, presumivelmente porque foram utilizadas doses muito baixas do

produto, o que constitui uma vantagem econômica e também ecológica deste bioinseticida já que, com 0,048 μ L de Triunvirato obtivemos alta mortalidade da praga de ambos os sexos (DL₉₀) e seletividade a planta hospedeira.

Segundo Koul *et al.* (2008), os compostos dos óleos essenciais são, principalmente, componentes lipofílicos que atuam como toxinas sobre parâmetros fisiológicos, biológicos e comportamentais dos insetos. Muitos destes constituintes identificados no Triunvirato já são conhecidos por suas propriedades inseticidas ou insetistáticas sobre espécies pragas, por exemplo: Citronellal e Geraniol são monoterpênicos conhecidos por suas propriedades repelentes (Kim *et al.* 2005, Muller *et al.* 2009, Kwon *et al.* 2010, Maia & Moore 2011, Dimetry 2014), enquanto 1,8-cineole (também conhecido por Eucalyptol) foi descrito por Sukontason *et al.* (2004) causando mortalidade em dípteros através de aplicações tópicas; Citronellol, por sua vez, foi capaz de causar dissuasão da oviposição e alimentar em *Callosobruchus analis* F. e *Sitophilus oryzae* L, respectivamente (Brari & Thakur 2016) e Linalool, interferiu no índice de crescimento de *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) (Singh *et al.* 2009).

Entre as vantagens de uma mistura, quando comparada com a composição química dos óleos essenciais isolados, é que com a adição de óleos existe a possibilidade de favorecer o sinergismo entre moléculas, potencializando a toxicidade contra a praga (Singh *et al.* 2009), ou seja, a mistura, muito possivelmente, aumentará a quantidade de constituintes com diferentes estruturas e distintos grupos químicos em uma única aplicação do produto, de modo que este enriquecimento químico pode representar maior toxicidade (Gallardo *et al.* 2012, Koul *et al.* 2013) e contribuir para evitar ou retardar o desenvolvimento da resistência pela praga (Feng & Isman 1995). Em Triunvirato, por exemplo, alguns dos componentes, com atividade inseticida já registradas, como Borneol, *E*-citral e Himachalol, foram doados exclusivamente por apenas um dos óleos essenciais utilizados para compor a mistura, de modo que podemos opinar que com a

incorporação deste óleo houve um favorecimento químico, tornando o produto mais agressivo contra o inseto.

Avaliações de Semicampo e Toxicidade de Triunvirato sobre *Psytalia concolor*. Os resultados encontrados em condições de semicampo (Tabela 4), apontaram maior toxicidade de Triunvirato sobre *Medfly* nas primeiras 24 horas da exposição da praga as plantas tratadas com o bioinseticida. Houve diferença da mortalidade de acordo com o sexo (35 % para machos e 22,5 % para as fêmeas) e, conseqüentemente, por se tratar de um produto botânico volátil, as taxas de mortalidade diminuíram conforme o tempo de avaliação. Ao final das 72 horas, Triunvirato expressou uma mortalidade acumulada de 46,2 % sobre o total de adultos de *C. capitata*.

Quanto a sua interação com o parasitoide *P. concolor*, Triunvirato foi classificado como inócuo, categoria 1 - IOBC (Hassan 1994; Sterk et al. 1999); enquanto o inseticida sintético Karate Zeon + 1,5 CS[®], utilizado como controle positivo, foi classificado como tóxico (categoria 4) tanto para a praga quanto para o inimigo natural, registrando maior toxicidade para *P. concolor* que para a praga (Fig. 2B), 97,7 e 87,5 % respectivamente. Logo, com os ensaios de semicampo três importantes dados foram obtidos: *I*-Triunvirato expressou toxicidade além de condições de laboratório, *II*- é compatível com o controle biológico realizado pelo parasitoide *P. concolor* e *III*- é um produto volátil e sustentável.

A diferença entre as taxas de mortalidade encontradas sobre *Medfly* em condições de semicampo e em laboratório, já era um resultado esperado, pois como afirma Cloyd & Chiasson (2007), óleos essenciais tendem a ser voláteis e estão sujeitados a fotodegradação, o que interfere na sua bioatividade. Assim, a redução da toxicidade do bioinseticida Triunvirato em condições não controladas, não constituiu um problema. No entanto, o problema é a maneira como os óleos essenciais e seus produtos derivados são avaliados, já que em geral, são rebaixados por não desenvolverem a mesma persistência apresentada pelos inseticidas sintéticos e, visto que estes são

pensados e produzidos sobretudo para proporcionar um efeito prolongado (Costa *et al.* 2004, Finkler 2012), os bioinseticidas de origem botânica são assim negativamente rotulados. Ou seja, porque não avaliam outros parâmetros que sejam justos com os bioinseticidas? Por exemplo, o fato de um produto natural, com apenas uma aplicação, ser suficiente para matar 46,2 % de moscas adultas de uma maneira limpa e ecológica? Ou mesmo, que quase 50 % de uma população de praga resistente foi morta por um bioinseticida e sem matar nenhum parasitoide?

Benelli *et al.* (2013) também encontraram resultados onde um inseticida natural, óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, apresentou maior toxicidade para adultos de *C. capitata* (0,117 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) que para *P. concolor* (0,147 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$), exemplificando assim a seletividade fisiológica dos inseticidas botânicos; bem como Zapata *et al.* (2004), que ao avaliar a toxicidade de substâncias isoladas a partir de sementes de *Trichilia havanensis* Jacq., encontraram uma baixa mortalidade do inimigo natural, não superando 10 %, além de verificar a inocuidade do biopesticida sobre as taxas de hospedeiros atacados e sobre a descendência de *P. concolor* cujas fêmeas adultas foram submetidas a aplicação tópica. Viñuela *et al.* (2001) demonstraram que inseticidas atualmente registrados para o controle de *Ceratitis*, são muito prejudiciais para *P. concolor*, sendo capazes de interferir negativamente na sobrevivência e capacidade benéfica deste parasitoide. Em nossos ensaios, Karate Zeon + 1,5 CS[®], se apresentou mais tóxico para o inimigo natural que para a praga confirmando que a propriedade “toxicidade não seletiva” é uma constante para os inseticidas sintéticos (Kakakhel *et al.* 1998, Desneux *et al.* 2007, Medina *et al.* 2008, Hall & Nguyen, 2010).

Uma das características apontadas contra a utilização dos óleos essenciais, para o controle de pragas, é sua rápida biodegradação quando comparada a durabilidade das moléculas sintéticas (Regnault-Roger *et al.* 2012). No entanto, Tripathi *et al.* (2009) relataram que a volatilidade dos óleos essenciais é uma característica que confere a vantagem de torná-los compatível com outros

métodos de controles ecologicamente favoráveis, tais como integração com entomopatógenos, predadores e parasitoides. *Triunvirato* apresentou uma relação atrativa entre seletividade fisiológica, compatibilidade e volatilidade, já que este produto natural formado por compostos voláteis registrou seletividade ao inimigo natural, sendo assim compatível com o controle biológico exercido pelo parasitoide *P. concolor*.

Segundo Isman (2008) as melhores oportunidades de mercado para os bioinseticidas de origem botânica, como *Triunvirato*, são as produções de cultivos orgânicos, onde existem menos produtos competidores e estes produtos biológicos são utilizados em condições ambientais controladas, todavia, isto requer um custo superior na produção quando comparado aos cultivos tradicionais. No entanto, sobretudo, que se deve avaliar a relação existente entre o custo para se obter produtos vegetais mais saudáveis e os extensos problemas de saúde pública resultantes do uso contínuo dos inseticidas sintéticos, tais quais: alterações endócrinas, anomalias congênitas, perda auditiva, distúrbios neuropsíquicos, disfunção na reprodução, ação imunossupressora e cancerígena (Moreira *et al.* 2002, Siqueira & Kruse 2008, Santos *et al.* 2015).

De acordo com os nossos resultados, *Triunvirato* é uma proposta ecológica e promissora ao manejo de baixo risco de *Medfly*, cuja relação aplicabilidade/benefícios pode ser duplamente favorável, seja como uma alternativa de combate a *C. capitata* nos cultivos orgânicos, seja fornecendo informações para o desenvolvimento de novas moléculas inseticidas obtidas a partir de compostos naturais; além disso, conforme o que propõem Silva *et al.* (2002), *Triunvirato* cumpre com os requisitos principais para ser avaliada e estudada sua utilização como um bioinseticida, já que: *I* – é composto por uma mistura de ingredientes ativos naturais o que dificulta o desenvolvimento de resistência pela praga, *II* – a matéria prima para sua produção é fácil de se obter, *III* – apresentou mortalidade em condições de laboratório além de semicampo e *IV* – demonstrou seletividade para o inimigo natural.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa PDSE (BEX 7003/15-03) outorgada ao primeiro autor, ao técnico da Universidad Politécnica de Madrid, Luis Quirós, pelo suporte na criação e manutenção dos insetos utilizados nos ensaios, assim como a Celeste Azpiazu e Alex Cristiano, por suas contribuições e sugestões neste trabalho.

Literatura Citada

- Adán, A., T. González, R. Bastante, F. Budia, P. Medina, P. Del Estal & E. Viñuela. 2007.** Efectos de diversos insecticidas aplicados en condiciones de laboratorio extendido sobre *Psytalia concolor* (Szèpligeti) (Hymenoptera: Braconidae). Bol. San. Veg. Plagas 33: 391-397.
- Alves, T.J.S., G.S. Cruz, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira, A.A. Correia & F.M. Cunha. 2014.** Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. Biotech. Histochem. 89: 245-255.
- Amer, A. & H. Mehlhorn. 2006.** Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol. Res. 99: 466-472.
- Arouri, R., G. Le Goff, H. Hemden, V. Navarro Llopis, M. M'saad, P. Castañera & F. Ortego. 2015.** Resistance to lambda cyhalothrin in Spanish field populations of *Ceratitis capitata* and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. Pest Manag. Sci. 71: 1281-1291.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oils—a review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.
- Batish, D.R., H.P. Singh, R.K. Kohli & S. Kaur. 2008.** Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manag. 256: 2166-2174.
- Batish, D.R., H.P. Singh, N. Setia, S. Kaur & R.K. Kohli. 2006.** Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oil from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. Z. Naturforsch. 61: 465-471.
- Benelli, G., A. Canale, G. Flamini, P.L. Cioni, F. Demi, L. Ceccarini & B. Conti. 2013.** Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). Ind. Crops Prod. 50: 596-603.

- Benelli, G., G. Flamini, A. Canale, P.L. Cioni & B. Conti. 2012.** Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Prot.* 42: 223-229.
- Bengochea, P., F. Budia, E. Viñuela & P. Medina. 2014.** Are kaolin and copper treatments safe to the olive fruit fly parasitoid *Psytalia concolor*? *J. Pest Sci.* 87: 351-359.
- Brari, J. & D.R. Thakur. 2016.** Insecticidal potential properties of citronellol derived ionic liquid against two major stored grain insect pests. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4: 365-370.
- Clemente, S.V., G. Mareggiani, B.E. Juárez, M.E. Mendiondo, C.M. van Baren, P.D.L Lira & G.E. Ferraro. 2008.** Insecticidal activity of the essential oil and extracts of *Gutierrezia mandonii* and *G. repens* (Asteraceae) growing in Argentina. *J. Essent. Oil Res.* 20: 276-278.
- Cloyd, R.A. & H. Chiasson. 2007.** Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. *J. Econ. Entomol.* 100: 459-466.
- Costa, E.L.N., R.D. Silva & L.M. Fiuza. 2004.** Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biol. Leopold.* 26: 173-185.
- Couso-Ferrer, F., R. Arouri, B. Beroiz, N. Perera, A. Cervera, V. Navarro-Llopis & F. Ortego. 2011.** Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 104: 1349-1356.
- Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, A.A.C. Teixeira, A.C. Araújo, T.J.S. Alves & M.O. Breda. 2015.** Alteraciones histológicas e histoquímicas provocadas por el aceite esencial de clavo de olor en las gónadas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Int. J. Morphol.* 33: 1393-1400.
- Desneux, N., A. Decourtye & J.M. Delpuech. 2007.** The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- Dimetry, N.Z. 2014.** *Advances in Plant Biopesticides.* India, Springer, 373.
- Elaissi, A., K.H. Salah, S. Mabrouk, K.M. Larbi, R. Chemli & F. Harzallah-Skhiri. 2011.** Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. *Food Chem.* 129: 1427-1434.
- Farhang, V., J. Amini, T. Javadi & A. Ebadollahi. 2013.** Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. against three *Phytophthora* species. *Greener J. Agric. Sci.* 3: 292-298.
- Feng, R. & I. Isman. 1995.** Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Cell Mol. Life Sci.* 51: 831-833.
- Finkler C.L.L. 2012.** Controle de insetos: uma revisão. *Acad. Pernambucana Cienc. Agron.* 8: 169-189.

- Gallardo, A., M.I Picollo, P. González-Audino & G. Mougabure-Cueto. 2012.** Insecticidal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 49: 332-335.
- González, M., F. Bahena & E. Viñuela. 1998.** Desarrollo de un método de semicampo para el estudio de los efectos secundarios de los productos fitosanitarios sobre el parasitoide *Opius concolor* Szèpligeti. *Bol San Veg Plagas* 24: 661-668.
- Hall, D.G. & R. Nguyen. 2010.** Toxicity of pesticides to *Tamarixia radiata*, a parasitoid of the Asian citrus psyllid. *BioControl* 55: 601-611.
- Hassan, S.A. 1994.** Activities of the IOBC/WPRS working group" pesticides and beneficial organisms". *IOBC WPRS Bull.* 17: 1-1.
- Hummelbrunner, L.A. & M.B. Isman. 2001.** Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- IBM Corp. Released. 2013.** IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0.
- Isman, M.B. 1997.** Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica* 25: 339-344.
- Isman, M.B. 2008.** Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag. Sci.* 64: 8-11.
- Jacas, J.A. & E. Viñuela. 1994.** Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* (Hym., Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Dip., Tephritidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 147-154.
- Kakakhel, S.A., K. Ahad, M. Amjad & S.A. Hassan. 1998.** The side-effects of pesticides on *Diaeretiella rapae*, a parasitoid of the turnip aphid (*Lipaphis erysimi*). *Anz. Schädl.* 71: 61-63.
- Kim, J.K., C.S. Kang, J.K. Lee, Y.R. Kim, H.Y. Han & H.K. Yun. 2005.** Evaluation of repellency effect of two natural aroma mosquito repellent compounds, citronella and citronellal. *Entomol. Res.* 35: 117-120.
- Koul, O., R. Singh, B. Kaur & D. Kanda. 2013.** Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. *Ind. Crops Prod.* 49: 428-436.
- Koul, O., S. Walia & G.S. Dhaliwal. 2008.** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4: 63-84.
- Kwon, Y., S.H. Kim, D.S. Ronderos, Y. Lee, B. Akitake, O.M. Woodward & C. Montell. 2010.** Drosophila TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal. *Curr. Biol.* 20: 1672-1678.

- Lee, H.S., W.K. Shin, C. Song, K.Y. Cho & Y.J. Ahn. 2001.** Insecticidal activities of ar-turmerone identified in *Curcuma longa* rhizome against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Asia-Pacific Entomol.* 4: 181-185.
- López, S.B., M.L. López, L.M. Aragón, M.L. Tereschuk, A.C. Slanis, G.E. Feresin & A.A. Tapia. 2011.** Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5286-5292.
- Maciel, M.V., S.M. Morais, C.M.L. Bevilaqua, R.A. Silva, R.S. Barros, R.N. Sousa & M.A. Souza-Neto. 2010.** Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* 167: 1-7.
- MAGRAMA-Ministry of Agriculture, Food and environment. 2016.** Official phytosanitary products entry. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp/> (accessed 10.07.16).
- Maia, M.F. & S.J. Moore. 2011.** Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar. J.* 10: 2-15.
- Masamba, W.R.L., J.F.M. Kamanula, E.M. Henry & G.K.C. Nyirenda. 2003.** Extraction and analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil: an essential oil with potential to control the larger grain borer (*Prostephanus truncatus*) in stored roducts in Malawi. *Malawi J. Agri. Sci.* 2: 56-64.
- Medina, P., J.J. Morales, M. González-Núñez & E. Viñuela. 2008.** Is the use of some selected insecticides compatible with two noctuid endoparasitoids: *Hyposoter didymator* and *Chelonus inanitus*. *IOBC/wprs Bull.* 35: 51-59.
- Miguel, M.G., M.L. Almeida, M.A. Gonçalves, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso & L.M. Pedro. 2010.** Toxic effects of three essential oils on *Ceratitis capitata*. *J. Essent. Oil Bearing Plants* 13: 191-199.
- Moreira, J.C., S.C. Jacob, F. Peres, J.S. Lima, A. Meyer, J.J. Oliveira-Silva & A.D. Araújo. 2002.** Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciênc. Saúde Col.* 7: 299-311.
- Moretti, M.D., E. Bazzoni, G.S. Passino & R. Prota. 1998.** Antifeedant effects of some essential oils on *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). *J. Essent. Oil Res.* 10: 405-412.
- Müller, G.C., A. Junnila, J. Butler, V.D. Kravchenko, E.E. Revay, R.W. Weiss & Y. Schlein. 2009.** Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J. Vector Ecol.* 34: 2-8.

- Nash, W.J. & T. Chapman. 2014.** Effect of dietary components on larval life history characteristics in the Medfly (*Ceratitis capitata*: Diptera, Tephritidae). PlosONE 9: e86029.
- Ootani, A.A., R.W. Aguiar, A.C.C. Ramos, D.R. Brito, J.B. Silva & J.P. Cajazeira. 2013.** Utilização de óleos essenciais na agricultura. J. Biotec. Biodivers. 4:162-175.
- Palacios, S.M., A. Bertoni, Y. Rossi, R. Santander & A. Urzúa. 2009.** Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. Molecules 14: 1938-1947.
- Papachristos, D.P., A.C. Kimbaris, N.T. Papadopoulos & M.G. Polissiou. 2009.** Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. Ann. Appl. Biol. 155: 381-389.
- Passino, G.S., E. Bazzoni, L. Moretti & R. Prota. 1999.** Effects of essential oil formulations on *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae) adult flies. J. Appl. Entomol. 123: 145-149.
- Pavela, R. 2008.** Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). Phytother. Res. 22(2): 274-278.
- Pavela, R. & G. Benelli. 2016.** Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constrains. Trends Plant. Sci. 21: 1000-1007.
- Plattier, M. & P. Teisseire. 1974.** Essential oil of the Atlas cedar. Recherches 19: 131-144.
- Poonpaiboonpipat, T., U. Pangnakorn, U. Suvunnamek, M. Teerarak, P. Charoenying & C. Laosinwattana. 2013.** Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). Ind. Crops Prod. 41: 403 - 407.
- Püntener, W. 1981.** Manual for field trials in plant protection. Switzerland, Syngenta International AG, 271.
- Regnault-Roger, C., C. Vincent & J.T. Arnason. 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. Annu. Rev. Entomol. 57: 405-424.
- Reis, S.L., A.G. Mantello, J.M. Macedo, E.A. Gelfuso, C.P. Silva, A.L. Fachin, A.M. Cardoso & R.O. Beleboni. 2016.** Typical monoterpenes as insecticides and repellents against stored grain pests. Molecules 21: 258-268.
- Robertson, J.R., H.K. Preisler & R.M. Russell. 2002.** Polo Plus. Probit and Logit Analysis user's guide, 36.
- Santos, J.A.T., M.R. Selegim, S.B. Nerilo, L.S. Fernandez & M.L.F. Oliveira. 2015.** Inseticidas organofosforados e intoxicação humana: uma breve revisão da produção científica sobre o tema. SaBios: Rev. Saúde Biol. 10: 54-65.

- Sarmiento-Brum, R.B.C., H.G. Castro, F.R. Gama, C.H. Cardon & G.R. Santos. 2014.** Phytotoxicity of essential oils in watermelon, bean and rice plants. *J. Biotec. Biodivers.* 5: 101-109.
- Silva, G., A. Lagunes, J. Rodríguez & D. Rodríguez. 2002.** Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Man. Integ. Plag. Agroecol.* 66: 4-12.
- Singh, H.P., D.R. Batish, N. Setia & R.K. Kohli. 2005.** Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Ann. Appl. Biol.* 146: 89-94.
- Singh, R., O. Koul, P.J. Rup & J. Jindal. 2009.** Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 29: 93-101.
- Siqueira, S.L.D. & M.H.L. Kruse. 2008.** Agrochemicals and human health: contributions of healthcare professionals. *Rev. Esc. Enferm. USP.* 42: 573-579.
- Sterk, G., S.A. Hassan, M. Baillod, F. Bakker, F. Bigler, S. Blümel, H. Bogenschütz, E. Boller, B. Bromand, J. Brun, J.N.M. Calis, J. Coremanspelseneer, C. Duso, A. Garrido, A. Grove, U. Heimbach, H. Hokkanen, J. Jacas, G.B. Lewis, L. Moreth, L. Polgar, L. Roversti, L. Samsøe-Petersen, B. Sauphanor, A. Schaub, A. Stäubli, J.J. Tuset, A. Vainio, M. van de Veire, G. Viggiani, E. Viñuela & H. Vogt. 1999.** Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'. *BioControl* 44: 99-117.
- Statpoint Technologies. 2013.** Statgraphic Centurion XVI (v. 16.2.04). Warrenton, VA, USA.
- Sukontason, K.L., N. Boonchu, K. Sukontason & W. Choochote. 2014.** Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 46: 97-101.
- Teisseire, P. & M. Plattier. 1974.** New bicyclic sesquiterpenoid ketone isolated from the essential oil of the Atlas cedar. *Recherches* 19: 167-172.
- Tripathi, A.K., S. Upadhyay, M. Bhuiyan & P.R. Bhattacharya. 2009.** A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharmacog. Phytother.* 1: 052-063.
- Viñuela, E., P. Medina, M. Schneider, M. González, F. Budia, A. Adán & P. Del Estal. 2001.** Comparison of side-effects of spinosad, tebufenozide and azadirachtin on the predators *Chrysoperla carnea* and *Podisus maculiventris* and the parasitoids *Opius concolor* and *Hyposoter didymator* under laboratory conditions. *IOBC WPRS Bull.* 24: 25-34.
- Weldon, C.W., L. Boardman, D. Marlin & J.S. Terblanche. 2016.** Physiological mechanisms of dehydration tolerance contribute to the invasion potential of *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) relative to its less widely distributed congeners. *Front. Zool.* 13: 2-15.

Zapata, N., P. Medina, M. Gonzalez, F. Budia, B. Rodríguez & E. Viñuela. 2004. Toxicidad de azadirona y 1,7+ 3,7-di-O-acetilhavanensina (4:1) sobre adultos de *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hym.: Braconidae). Bol. Sanid. Veg. Plagas 30: 783-789.

Tabela 1. Doses letais 50 % (DL₅₀) resultantes da interação dos óleos essenciais *Amyris balsamifera*, *Cedrus atlantica*, *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Pelargonium graveolens* com adultos recém emergidos de *C. capitata* (N = 40, por sexo) avaliados 72 horas após aplicação tópica na região protorácica.

Toxicidade sobre <i>Ceratitis capitata</i> adultas					
Óleo essencial		µL/mosca (95 % LC)	Inclinação ± SE	χ ²	GL
<i>Amyris balsamifera</i> (Sândalo)	♂	0,014 (0,005 - 0,023)	1,819 ± 0,443	0,537	4
	♀	0,026 (0,018 - 0,034)	2,840 ± 0,550	0,943	4
<i>Cedrus atlantica</i> (Cedro)	♂	0,012 (0,008 - 0,014)	3,769 ± 0,975	0,640	5
	♀	0,015 (0,011 - 0,019)	3,070 ± 0,635	1,878	5
<i>Corymbia citriodora</i> (Eucalipto)	♂	0,032 (0,025 - 0,039)	4,027 ± 0,750	2,039	4
	♀	0,033 (0,027 - 0,040)	4,878 ± 0,923	2,998	4
<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim limão)	♂	0,014 (0,013 - 0,017)	6,421 ± 1,334	1,447	6
	♀	0,022 (0,017 - 0,028)	3,938 ± 0,856	0,046	4
<i>Pelargonium graveolens</i> (Gerânio)	♂	0,029 (0,014 - 0,045)	2,496 ± 0,468	4,734	4
	♀	0,029 (0,021 - 0,039)	2,617 ± 0,490	3,222	4

LC: Limites de confiança.

Tabela 2. Toxicidade de misturas de óleos essenciais sobre adultos de *Ceratitis capitata* (N=40) após 72 horas da aplicação tópica na região protorácica e suas medidas de interação.

DL ₅₀ de <i>Ceratitis capitata</i> adultos							
Mistura		μL/ <i>Ceratitis</i> (95% LC)	Inclinação ± SE	χ ²	GL	E	Efeito
CEL	♂	0,018 (0,012 - 0,029)	2,914 ± 0,537	4,459	4	0,0157	Aditivo
Cedro + Eucalipto + Capim limão	♀	0,018 (0,012 - 0,029)	3,040 ± 0,540	5,983	4	0,0233	Aditivo
SLC	♂	0,016 (0,013 - 0,019)	4,176 ± 0,690	3,000	3	0,0133	Aditivo
Sândalo + Capim limão + Cedro	♀	0,018 (0,013 - 0,029)	3,340 ± 0,556	6,678	4	0,0209	Aditivo
GES	♂	0,015 (0,011 - 0,019)	2,544 ± 0,359	6,235	8	0,0249	Aditivo
Gerânio + Eucalipto + Sândalo	♀	0,029 (0,025 - 0,033)	3,152 ± 0,358	7,984	8	0,0286	Aditivo

LC: Limites de confiança. E: Mortalidade esperada.

Tabela 3. Caracterização química da mistura **CEL** e dos óleos essenciais de Cedro (*Cedrus atlantica*), Eucalipto (*Corymbia citriodora*) e Capim limão (*Cymbopogon citratus*).

RI	Componente	Cedro (%)	Eucalipto (%)	Capim limão (%)	Mistura CEL (%)	Identificação ^a
937	α -pinene	0,36	0,66	0,07	0,34	1,2,3
953	Camphene	-	0,08	1,33	0,31	1,2,3
975	β -pinene	0,07	0,12	0,02	0,06	1,2,3
1017	1,8-cineole	0,12	8,27	0,80	3,64	1,2,3
1034	1,4-cineole	<i>tr</i>	0,03	1,29	0,71	1,2,3
1043	(<i>E</i>)- β -ocimene	0,03	0,19	<i>tr</i>	0,05	1,2,3
1087	Terpinolene	-	0,22	<i>tr</i>	0,07	1,2,3
1100	β -linalool	-	0,24	1,16	0,38	1,2,3
1117	Fenchol	0,05	-	0,28	0,29	1,2,3
1131	Limonene oxide	-	0,03	0,60	0,35	1,2,3
1140	Isopulegol	-	0,57	0,04	0,19	1,2
1157	α -citronellal	0,05	66,48	0,57	18,09	1,2,3
1167	Borneol	-	-	<i>tr</i>	0,32	1,2,3
1181	p-Cymen-8-ol	-	0,84	0,09	0,21	1,2,3
1230	β -citronellol	0,25	4,83	0,04	2,27	1,2,3
1251	Z-citral	-	0,21	28,5	8,16	1,2,3
1260	Geraniol	0,25	0,02	1,27	0,77	1,2,3
1262	E-citral	-	-	52,84	15,05	1,2,3
1351	α -cubebene	0,14	1,38	0,29	0,13	1,2
1353	Citronellyl acetate	0,35	0,03	0,12	0,74	1,2,3
1375	α -copaene	-	0,16	2,14	0,68	1,2,3
1382	Geranyl acetate	0,03	0,22	0,59	0,34	1,2,3
1407	Longifolene	0,22	-	1,01	1,06	1,2
1408	α -longipinene	1,61	0,04	0,07	0,88	1,2

Tabela 3. Continuação.

1420	(E)- caryophyllene	0,16	0,5	0,29	0,70	1,2,3
1442	α -himachalene	16,48	-	0,14	18,21	1,2
1475	γ -himachalene	0,78	0,09	0,16	0,33	1,2
1477	γ - muurolene	0,22	<i>Tr</i>	-	0,04	1,2
1481	Germacrene D	-	0,29	0,17	0,12	1,2
1500	α -muurolene	6,39	-	<i>Tr</i>	1,46	1,2
1501	β -himachalene	59,25	-	0,95	18,32	1,2
1513	γ -cadinene	1,14	0,08	-	0,39	1,2
1514	β -bisabolene	0,88	0,04	0,10	0,31	1,2
1515	Cubebol	0,91	-	-	0,29	1,2
1531	α -cadinene	0,90	0,06	0,15	0,42	1,2
1536	γ -bisabolene	1,08	-	-	0,35	1,2
1549	β -elemol	<i>tr</i>	-	0,18	0,05	1,2
1582	Caryophyllene oxide	-	0,39	0,02	0,17	1,2,3
1592	Longiborneol	0,7	0,06	-	0,25	1,2
1608	Longipinene	0,59	0,06	0,17	0,18	1,2
1648	Himachalol	0,93	-	-	0,31	1,2
1702	1-Tetradecanol	<i>tr</i>	1,16	-	0,33	1,2,3

Componentes listados em ordem crescente de Índice de Retenção (RI). O RI programado por temperatura refere-se a n-alcanos (C8-C24), determinados em uma coluna capilar HP-5 MS. Os valores percentuais inferiores a 0,1% são indicados como tr (traços). ^C1: Índice de retenção linear, 2: Espectro de massa (bibliotecas Wiley 275L e NIST), 3: Coinjeção com padrão autêntico.

Tabela 4. Mortalidade de *Ceratitis capitata* e *Psytalia concolor* após exposição a laranjeiras tratadas como a mistura de óleos essenciais CEL (4.8%) e o inseticida sintético Karate Zeon + 1.5 CS® (0,13%) em condições de semicampo.

Espécie	Tratamento	Sexo	Mortalidade (%) em diferentes intervalos de exposição ¹						Mortalidade acumulada (%)	Categoria IOBC
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h		
<i>Ceratitis capitata</i>	Mistura (CEL)	♂	35,0 ± 5,0	28,7 ± 3,5 b	12,5 ± 2,5	10,0 ± 0,0 b	7,5 ± 4,8	7,5 ± 2,5 a	46,2 ± 7,0 b	-
		♀	22,5 ± 2,5		7,5 ± 2,5		7,5 ± 2,5			
	Lambda-cialotrina	♂	65,0 ± 2,9	58,7 ± 2,9 a	20,0 ± 4,1	21,2 ± 2,3 a	10,0 ± 4,1	7,5 ± 2,5 a	87,5 ± 4,9 a	-
		♀	52,5 ± 2,5		22,5 ± 2,5		5,0 ± 2,9			
<i>F</i> _{2,21}			139,39		38,45		2,50		77,80	
<i>P</i>			<0,0001		<0,0001		0,0236		0,0236	
<i>Psytalia concolor</i>	Mistura (CEL)	♂	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 b	1
		♀	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0			
	Lambda-cialotrina	♂	90,0 ± 5,8	72,5 ± 7,5 a	10,0 ± 5,8	17,5 ± 4,5 a	0,0 ± 0,0	7,5 ± 3,7 b	97,7 ± 2,5 a	4
		♀	55,0 ± 5,0		25,5 ± 5,0		15,0 ± 5,0			
<i>F</i> _{2,21}			93,44		14,91		4,20		1521,00	
<i>P</i>			<0,0001		<0,0001		0,0292		<0,0001	

¹Dentro da mesma coluna, os dados (média ± erro padrão) seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$). Categorias IOBC para experimentos de semicampo: 1 = inócuo (< 25%), 2 = ligeiramente tóxico (25-50%), 3 = moderadamente tóxico (51-75%) e 4=tóxico (> 75%) (Sterk *et al.* 1999, Hassan 1994). A mortalidade nos controles foi 0 e nenhum valor foi incluído na tabela. No entanto, eles foram incluídos nas análises estatísticas.

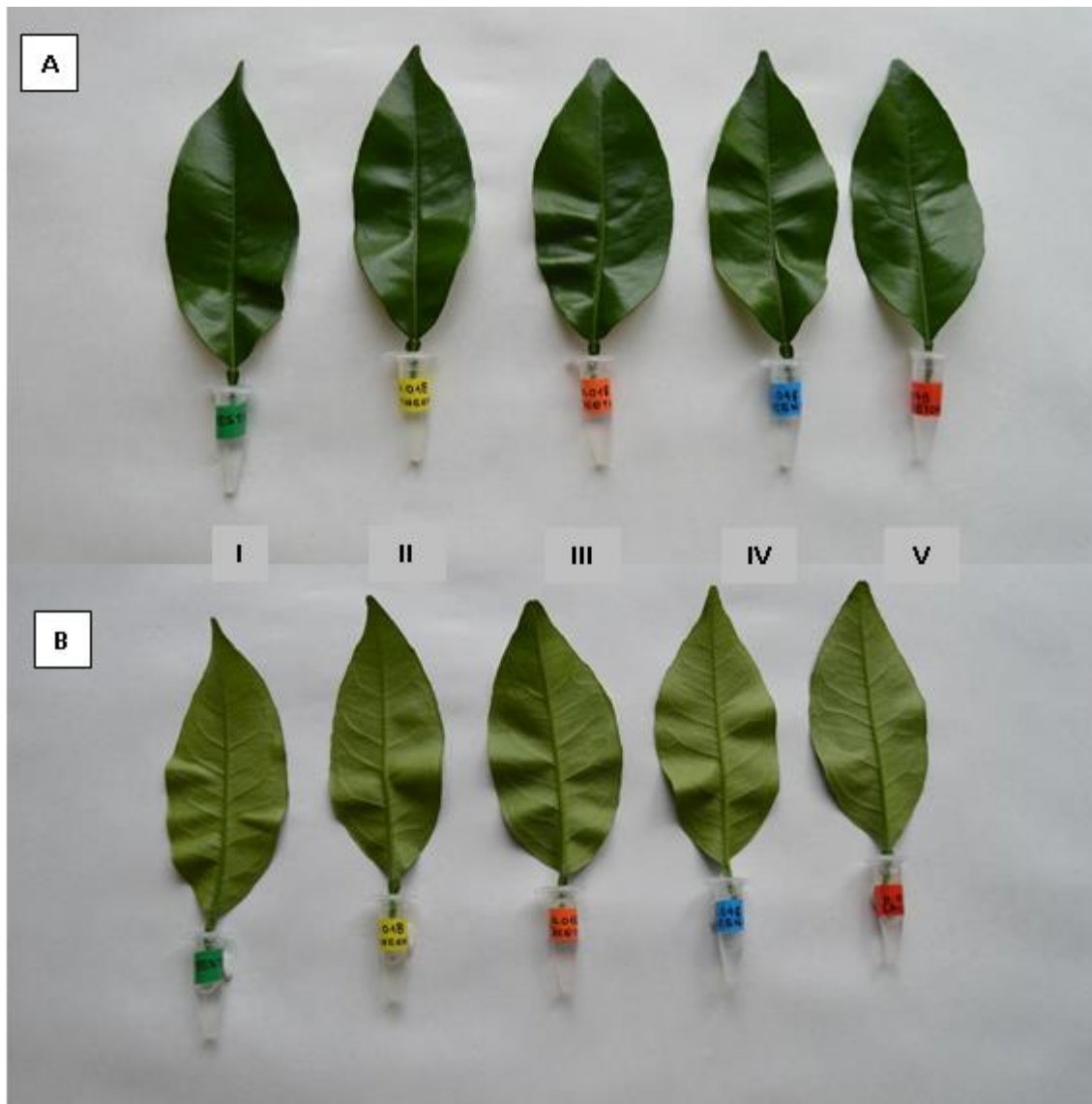


Figura 1. Avaliação da fitotoxicidade da mistura de óleos essenciais (CEL) em folhas de laranjeiras. A – Vista frontal e B – vista dorsal. I - Controle, II- 0,018 μ L + TweenTM 80, III - 0,018 μ L acetona, IV- 0,048 μ L + TweenTM 80 e V - 0,048 μ L acetona.

CAPÍTULO 4

ECOTOXICIDADE DE UM BIOINSETICIDA BOTÂNICO SOBRE O ENDOPARASITOIDE *Psytalia concolor* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)¹

THIAGO J.S. ALVES¹, ANA MURCIA², ANDREA WANUMEN², VALÉRIA W. TEIXEIRA^{1,3}, ÁLVARO
A.C. TEIXEIRA³ E PILAR MEDINA²

1 Departamento de Agronomia-Entomologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av.

Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. 52171-900. Recife- PE, Brasil.

2 Unidad de Protección de Cultivos. Departamento de Producción Agraria. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid. 28040. Madrid, Spain.

3 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. 52171-900. Recife- PE, Brasil.

¹Alves, T.J.S., A. Murcia, A. Wanumen, V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira & P. Medina. Ecotoxicidade de um bioinseticida botânico sobre o endoparasitoide *Psytalia Concolor* (Hymenoptera: Braconidae). A ser submetido a Ecotoxicology.

RESUMO - Os programas de Manejo Integrado de Pragas nem sempre priorizam os inimigos naturais na tomada de decisão quanto ao método de controle utilizado, afetando, muitas vezes, a ação desses importantes agentes redutores de populações de pragas nos agroecossistemas. A proposta desta pesquisa foi avaliar a interação de *Triunvirato*, um bioinseticida formulado a partir da mistura dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica* e *Corymbia citriodora*, sobre *Psytalia concolor*, um parasitoide de Tefritídeos. Os resultados demonstraram que *Triunvirato* apresentou seletividade fisiológica em favor do inimigo natural. O tratamento 0,018µL/inseto (DL₅₀ para *Ceratitidis capitata*), não acarretou danos sobre a capacidade benéfica deste parasitoide, enquanto que a dosagem de 0,048µL/inseto (DL₉₀ *Ceratitidis capitata*) foi capaz de afetar negativamente o número de hospedeiros atacados e a progênie, no entanto, essa interferência foi extinta a partir do terceiro e quarto dia de avaliação, respectivamente. Por fim, a partir dos testes de persistência, o produto foi classificado como inócuo a *P. concolor*.

PALAVRAS-CHAVE: Interação parasitoide-bioinseticida, seletividade fisiológica, *Ceratitidis capitata*, mistura de óleos essenciais, capacidade benéfica

ECOTOXICITY OF A BOTANICAL BIOINSECTICIDE ON THE ENDOPARASITOID *Psytalia concolor* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

ABSTRACT – Integrated Pest Management programs do not always prioritize natural enemies in decision making regarding the control method used, often affecting the action of these important pest population reducing agents in agroecosystems. The purpose of this research was to evaluate the interaction of Triunvirato, a bioinsecticide developed from the mixture of the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica* and *Corymbia citriodora* bioinsecticide, developed from the mixture of essential oils, with *Psytalia concolor*, a parasitoid of Tephritidea. The results showed that the product presented physiological selectivity in favor of the natural enemy. The treatment 0,018 μ L / insect (LD₅₀ to *Ceratitis capitata*) did not cause damages on the beneficial capacity of this parasitoid, whereas the 0,048 μ L / insect (DL₉₀ Medfly) dosage was able to temporarily affect the number of hosts attacked and progeny, however, this interference was extinguished after the third day of evaluation. Finally, from the persistence tests, the product was classified as innocuous for P. concolor.

KEY WORDS: Interaction parasitoid-bioinsecticide, physiological selectivity, *Ceratitis capitata*, mixture of essential oils, beneficial capacity

Introdução

Os himenópteros parasitoides constituem um grande e benéfico grupo de insetos com alta relevância no controle biológico de pragas, com aproximadamente 66.000 espécies já descritas; a biologia desses insetos é bastante diversa, visto que agrupa parasitoides primários e secundários, espécies solitárias e gregárias, tanto ecto quanto endoparasitoides (Berta & Colomo 2000, Toscano & Carvalho 2000a, Cirelli & Pentead-Dias 2003, Dey & Akhtar 2007, Triplehorn & Jonhson 2011). Diversas ordens de insetos pragas, dentre elas Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera, são descritas sendo parasitadas por uma ou mais espécies de himenópteros (Matthews 1974, Huber 2009, Marinho *et al.* 2009, Zikic *et al.* 2011). No entanto, embora apresentem tamanha importância na redução natural das populações de insetos pragas, em muitos programas de manejo, esses parasitoides não são priorizados no momento da tomada de decisão quanto ao método de controle a ser utilizado.

Assim, as medidas de controle até então pensadas para favorecer a mortalidade da praga, podem resultar em efeitos deletérios sobre esses importantes inimigos naturais, visto que a interação dos parasitoides com os inseticidas pode afetar desde seus parâmetros biológicos a comportamentais (Morales *et al.* 2004; Charleston *et al.* 2005; Matos *et al.* 2006; Desneux *et al.* 2007; Alyokhin *et al.* 2010). Inseticidas podem reduzir o desempenho do inimigo natural inviabilizando seu correto funcionamento, e conseqüentemente, diminuir sua capacidade benéfica (Desneux *et al.* 2007, Medina *et al.* 2008, Medina *et al.* 2012); além disso, a interação com moléculas tóxicas pode suprimir a capacidade do parasitoide de driblar as defesas imunológica do hospedeiro, através da redução da mobilidade hemocitária acarretando danos ao processo de detoxificação (Delpuech & Tekinel-Ozalp 1991). Inseticidas podem também acarretar danos aos parasitoides interferindo no desenvolvimento das estruturas locomotoras e sensoriais (Moreno *et*

al. 1993, Charleston *et al.* 2005), intervir na reprodução (Penagos *et al.* 2005), alterar a composição bioquímica desses insetos (Schneider *et al.* 2004), modificar o comportamento de seleção do hospedeiro e oviposição (Desneux *et al.* 2004, Alyokhin *et al.* 2010), além de reduzir a longevidade dos adultos (Volpe *et al.* 2011).

A proposta do Manejo Integrado de Pragas (MIP) visa à utilização associativa de metodologias que evitem e ou minimizem o desenvolvimento de efeitos secundários, tais como resistência de pragas, morte de insetos benéficos, contaminação ambiental e alimentar. Logo, as alternativas de controle, sobretudo os bioinseticidas, ganharam visibilidade nos programas de controle de pragas. Esses produtos de origem natural são pensados, sobretudo, para evitar danos a biota benéfica (Biondi *et al.* 2013), sendo, em geral, dotados de seletividade fisiológica em favor do organismo não alvo, expressando assim maior toxicidade sobre a praga-alvo que ao inimigo natural.

Contudo, os bioinseticidas são erroneamente associados como inócuos aos parasitoides por serem produtos de origem natural, no entanto, pesquisas focadas em avaliar a interação parasitoide-bioinseticida tem demonstrado que esses bioprodutos, de diferentes naturezas, são, muitas vezes, incompatíveis com a ação do inimigo natural. Suthisut *et al.* (2011) demonstraram que o óleo essencial de *Alpinia pequena* (*Alpinia conchigera* Griff., Zingiberaceae) é nocivo a ação de parasitismo exercido por *Trichogramma deion* Pinto & Oatmam (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Baur & Boethel (2003), por sua vez, demonstraram que a δ -endotoxina expressada pelo *Bacillus thuringiensis* Berliner Cry1A, utilizada para o controle de pragas da soja, foi capaz de interferir na sobrevivência e fecundidade de duas espécies de himenópteros endoparasitoides associadas a esta cultura; já Hamm *et al.* (1985) constataram que um vírus entomopatogênico de ocorrência natural sobre populações de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith

(Lepidoptera: Noctuidae), era capaz de afetar negativamente diversos parâmetros de *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de populações de *S. frugiperda*.

Psytalia concolor (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) é um parasitoide cenobionte responsável pela redução natural de populações de muitas espécies de Tefritídeos (Diptera: Tephritidae), dentre elas a mosca da fruta do mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Adán *et al.* 2007, Benelli *et al.* 2012, Bengochea *et al.* 2014). As fêmeas do parasitoide realizam a deposição dos ovos no interior do hospedeiro, onde se desenvolve todo o ciclo biológico, posteriormente, a emergência da vespa adulta, resulta na morte da espécie praga. Viñuela *et al.* (2001) e Zapata *et al.* (2004) afirmam que algumas moléculas, de origem natural, foram capazes de interferir negativamente no desempenho deste parasitoide, de modo que, classificaram *P. concolor* como um excelente bioindicador, devido à alta sensibilidade apresentada pela espécie quanto as toxinas testadas.

Logo, utilizando, como modelo experimental, o parasitoide *P. concolor* e um bioinseticida desenvolvido por nossa equipe através da mistura dos óleos essenciais de cedro (*Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, Pinaceae), Eucalipto (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson, Myrtaceae) e capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, Poaceae) denominado Triunvirato, esta pesquisa objetivou avaliar a interferência deste bioinseticida sobre a sobrevivência e a capacidade benéfica desse inimigo natural, de modo a *I-* avaliar a toxicidade do bioinseticida sobre *P. concolor*, *II-* verificar a interferência do bioinseticida sobre a capacidade benéfica do parasitoide, assim como *III-* analisar a persistência desse produto em condições de semicampo e sua interação com *P. concolor*.

Material e Métodos

Insetos. Os insetos foram obtidos da criação existente na Unidad de Proteccion de Cultivos, da Universidad Politécnica de Madrid, Espanha, onde os adultos de *C. capitata* eram mantidos em gaiolas retangulares de metacrilato (50 x 40 x 40 cm) com bebedouro (250 mL) e alimentadas com uma dieta de soja hidrolisada e açúcar na proporção 1:4 (v:v), respectivamente. As gaiolas, por sua vez, estavam acondicionadas em câmara climatizadas a temperatura de 25 ± 2 °C, 74 ± 5 % de umidade relativa e fotoperíodo de 16 horas de luz. O parasitoide *P. concolor* foi criado de acordo com a metodologia desenvolvida por Jacas & Viñuela (1994) sendo mantidos sobre larvas de ultimo instar de *C. capitata* e alimentados com uma mistura de levedura seca de cerveja e açúcar moído, na proporção de 4:1 v:v, sendo também acondicionados em câmara climatizada sobre as mesmas condições de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo.

Bioensaios da Toxicidade de Triunvirato sobre *Psytalia concolor*. O bioinseticida botânico foi desenvolvido através da mistura, na proporção de 1:1:1, dos óleos essenciais de Capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, Poaceae), Cedro (*Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, Pinaceae) e Eucalipto (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson, Myrtaceae). Os óleos essenciais foram produzidos e distribuídos por Arte dos aromas I.C. LDTA, sendo estes obtidos em lojas de especiarias na região metropolitana do Recife-PE, Brasil. Para determinação da dose letal 50 % de *Triunvirato* sobre *P. concolor*, 20 insetos adultos, 10 machos (peso médio: 0,00466 g) e 10 fêmeas (peso médio: 0,00498 g) com idade de 24 horas após emergidos, foram utilizados em cada uma das doses avaliadas do bioinseticida, sendo estas: 0,5, 0,25, 0,1, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005 e 0,0025 µL de óleo essencial/parasitoide, diluídas em acetona (99,9% richness; Panreac[®], Barcelona, Espanha); assim cada inseto recebeu, através de aplicações tópicas com micropipetas eletrônicas de alto rendimento (Pipet4[®]u Revolution, AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Germany), 0,5 µL de solução em sua

região protoráxica. O grupo controle recebeu apenas acetona (0,5 µL). O experimento foi realizado em quadruplicata.

Posteriormente, os insetos foram acondicionados em recipientes plásticos de 12 cm x 5 cm (diâmetro x altura) com tampa ventilada, onde recebiam água e alimento diariamente, sendo mantidos em câmara climatizada (25 °C ± 2 °C, UR: 74 ± 5 % e fotoperíodo 16 h Luz: 8 h Escuro). A mortalidade foi avaliada com 24, 48 e 72 horas depois da aplicação tópica e o critério de mortalidade, foi baseado na ausência de mobilidade dos insetos após serem tocados com um pincel de cerdas suaves. Os dados da mortalidade foram submetidos ao programa POLO-Plus para obtenção das doses letais.

Avaliação da Interferência de Triunvirato sobre a Capacidade Benéfica de *Psytalia concolor*. Para determinação da influência de *Triunvirato* sobre o número de hospedeiros atacados e da progênie resultante, adaptamos e utilizamos a metodologia desenvolvida por Jacas & Viñuela (1994), assim, fêmeas com cinco dias de idade, acasaladas, alimentadas e sem experiência de parasitismo, foram acondicionadas em arenas experimentais compostas por recipientes de vidro de 3 cm de diâmetro e 3,5 cm de altura, coberto por uma tela voil (7 cm²) para promover ventilação. No interior de cada arena experimental foi depositada uma fêmea de *P. concolor* além de uma pequena porção de dieta (levedura de cerveja + açúcar moído na proporção de 1: 4) e água. Cada recipiente recebeu 5 larvas de último instar (L4) de *C. capitata*, sendo estas mantidas sobre o voil e levemente pressionadas com o auxílio de um peso auxiliar para evitar fuga das larvas hospedeiras. Os tratamentos foram aplicados no voil através da imersão deste no tratamento a ser avaliado e posteriormente postos para secar a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos. Ao todo, cada grupo avaliado: tratamento 0,018 µL, tratamento 0,048 µL e controle; foi composto por 25 repetições, com tempo de parasitismo de 1 hora, avaliadas sempre as 12:00 h durante 10 dias consecutivos. As arenas eram mantidas em câmara climatizada com fotoperíodo, temperatura

e umidade monitorados (Temperatura: 20 ± 2 °C, umidade relativa: 65 ± 5 % e fotoperíodo: 16 h. luz/8 h escuro). Após o intervalo de 1 hora, tempo total de parasitismo, as larvas de *C. capitata* foram acondicionadas em recipientes plásticos de 12 cm x 8cm com 30 poços individuais e monitorados por 31 dias, período de tempo suficiente para verificar eclosão dos adultos do parasitoide ou de *C. capitata*.

Assim, de acordo com Gonzalez *et al.* (2001), a capacidade benéfica foi medida de acordo com dois parâmetros:

O número de hospedeiros atacados (HA), que se calculou como a porcentagem de pupas dos quais emergiram moscas, visto que a emergência de hospedeiros não parasitados é praticamente 100%;

A porcentagem de descendentes produzidos (D), que se calculou como a porcentagem de adultos emergidos de *P. concolor*.

Bioensaios da Persistência do Triunvirato em Casa de Vegetação. Para estudar a persistência do *Triunvirato* em comparação com dois produtos comerciais, um deles utilizado na agricultura orgânica (caulim) e o outro na agricultura convencional (lambda-cialotrina), foram utilizados os seguintes tratamentos: *Triunvirato* (9,6 mL *Triunvirato* + 3 mL Tween™ 80 + 187,4 mL água destilada), caulim (Surround WP®, 95 WP, Basf Española S.L, Barcelona, Espanha), e lambda-cialotrina (Karate Zeon + 1,5 CS®, 1,5 % CS, Syngenta Agro S.A., Madri, Espanha); além das combinações binárias: *Triunvirato* + lambda-cialotrina, *Triunvirato* + caulim e lambda-cialotrina + caulim. O grupo controle foi composto por água + Tween™ 80, 1,5 %. Os produtos foram aplicados sobre as laranjeiras, no exterior da casa de vegetação, até o ponto de gotejamento através de aplicadores manuais de 200 mL, posteriormente foram postos para secar a temperatura ambiente. *Triunvirato* foi aplicado na $DL_{90}=0,048$ µL/inseto (4,8 %), e caulim e lambda-

cialotrina, em suas concentrações máximas registradas para o controle de *C. capitata* em culturas de citros na Espanha, 0,13% e 50 kg/ha, respectivamente (Magrama 2017).

Os tratamentos foram aplicados em Laranjeiras var. Navelina com 16 meses de idade obtidas de Viveros Sevilla S.A. (Espanha), estas foram mantidas em vasos de 17 L com substrato de turfa e sem fertilizante, sendo irrigadas por gotejamento do início até o final dos bioensaios a cada dois dias. As laranjeiras foram tratadas, fora da casa de vegetação, com aplicadores manuais de 200 mL, até o ponto de gotejamento. Uma vez secas, as laranjeiras tratadas foram introduzidas em gaiolas (60 cm x 25 largura x 25 de comprimento) com um design ligeiramente modificado de González-Núñez *et al.* (1998) e mantidas em casa de vegetação. Cada planta foi considerada uma repetição, sendo realizadas quatro repetições por tratamento. Dois frascos pequenos de vidro forneciam água e dois pequenos potes plásticos continham a dieta alimentar, estando os recipientes amarrados nos ramos. A sobrevivência dos insetos foi avaliada às 24, 48 e 72 horas após a exposição às laranjas tratadas.

As plantas foram mantidas, para avaliar a degradação dos resíduos, de 20 de junho a 29 de julho de 2016, em uma estufa em Madri (Espanha) equipada com sistemas de refrigeração e aquecimento. A temperatura e a umidade foram monitoradas usando um coletor de dados (Tinytag® Ultra-Gemini Data Logger GLM) e, da mesma forma, as radiações UV e PAR foram gravadas através de radiômetros (Ultra-Violet Meter® MU-200 e Quantum-Meter® BQM, Apogee Instruments). As medidas de radiação foram realizadas sempre ao meio-dia durante todo o período do experimento, tanto em áreas dentro da estufa quanto fora. As condições ambientais médias durante o envelhecimento dos resíduos foram: $20,4 \pm 11$ °C, $53,6 \pm 25$ % e fotoperíodo de 15 h de luz natural; Radiação UV= $23,66 \text{ Wm}^{-2}$ (dentro) e $52,23 \text{ Wm}^{-2}$ (fora), Radiação PAR= $295,28 \text{ Wm}^{-2}$ (dentro) e $423,94 \text{ Wm}^{-2}$ (fora).

Grupos de adultos de *C. capitata* com menos de 24 horas de idade (10 machos e 10 fêmeas), juntamente com adultos de *P. concolor* (5 machos e 5 fêmeas) foram liberados em cada gaiola às 4 h, 4d, 8d, 15d, 21d e 30 d após o tratamento. A mortalidade foi verificada até três dias após cada introdução dos insetos. Os insetos foram considerados mortos quando permaneciam no fundo da gaiola ou nas folhas, sem reagir depois de serem tocadas com uma escova de cerdas macias.

Análise Estatística. No experimento para testar a toxicidade de Triunvirato em adultos de *P. concolor*, as doses letais e os limites fiduciais a 95 % foram calculados por análise Probit utilizando o programa POLO-Plus® (Roberston *et al.* 2002).

No experimento para testar os efeitos subtletais de Triunvirato em *P. concolor*, as taxas de hospedeiros atacados e tamanho da progênie foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) e ao teste de Fisher (LSD) para cada dia de parasitismo e para todos os dados estabelecidos. Quando necessário, os dados foram transformados em arco seno $\sqrt{(x/100)}$ quando expressos como uma porcentagem ou transformados em $\log(x + 1)$ quando não expressos como uma porcentagem. Os dados não transformados são demonstrados nas tabelas. Quando as transformações não conseguiram cumprir os pressupostos de ANOVA, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado. Os valores médios foram considerados significativamente diferentes quando os intervalos de confiança de 95 % das medianas não se sobrepueram.

No experimento de persistência, para estudar as diferenças entre espécies (*Ceratitis capitata* e *Psytalia concolor*), os dados de mortalidade foram submetidos a uma análise de variância de três vias (ANOVA), sendo espécies, tratamento e data de tratamento (DAT), as variáveis fixas. Além disso, todas as espécies foram analisadas individualmente por uma nova ANOVA de três vias com sexo, tratamento e data de tratamento (DAT) como variáveis fixas. Todas as análises ANOVA foram realizadas utilizando a versão Statgraphics Centurion® (Statpoint Technologies, 2013) e SPSS Statistics® (IBM 2013).

Resultados

Toxicidade de Triunvirato sobre o parasitoide *Psytalia concolor* em Condições de Laboratório. Os resultados encontrados indicaram que *Triunvirato* apresenta seletividade fisiológica ao parasitoide *P. concolor*. Na tabela 1, encontram-se expressadas as doses letais resultantes da interação do bioinseticida com adultos desse inimigo natural após 72 horas de avaliação, onde os machos de *P. concolor* apresentaram-se mais susceptíveis que as fêmeas, com DL_{50} de 0.044 $\mu\text{L}/\text{inseto}$. De acordo com as dosagens encontradas, o bioinseticida foi classificado como inócuo a *P. concolor*, sendo, portanto, agrupado na categoria 1 da escala IOBC (mortalidade < 30%).

Avaliação da Interferência de Triunvirato sobre a Capacidade Benéfica de *Psytalia concolor*. Nas avaliações de interferência do *Triunvirato* sobre a capacidade benéfica de *P. concolor*, foi constatado que a dose de 0.018 $\mu\text{L}/\text{inseto}$ (DL_{50} para *C. capitata*) não afetou a capacidade benéfica de *P. concolor* (hospedeiros atacados = $97,5 \pm 0,7$ e progênie = $82,3 \pm 1,7$) quando comparados ao grupo controle ($97,7 \pm 0,7$ e $76,6 \pm 1,6$, respectivamente), no entanto, a dosagem de 0,048 $\mu\text{L}/\text{inseto}$ foi capaz de afetar negativamente o número de hospedeiros atacados (Fig. 1A) assim como o número de descendentes gerados (Fig. 1B), contudo não acarretou a mortalidade do inimigo natural. Além do mais, tratou-se de uma interferência temporária, não mais tendo influência após o período de 3 dias, sobre o número de hospedeiros atacados, e de 4 dias, sobre a progênie. Posteriormente a esses intervalos de tempo específicos, o grupo de parasitoides exposto a dosagem de 0.048 $\mu\text{L}/\text{inseto}$, expressou capacidade benéfica superior a 90% de hospedeiros atacados e com mais de 80% de viabilidade de descendentes produzidos (Figs. 1A e 1B).

Bioensaios da Persistência do Triunvirato em Casa de Vegetação. A partir da ANOVA de três vias com espécies, tratamentos e datas após o tratamento (DAT) como fatores, foram encontradas

diferenças estatísticas para o tratamento e DAT ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Houve interações significativas entre os tratamentos e as duas espécies ($P < 0,0001$), uma vez que a resposta de cada espécie ao tratamento foi diferente. Da mesma forma, o tratamento e as datas de tratamento interagiram ($P = 0,0001$), mas, embora o tempo e as condições ambientais representassem a degradação de cada produto ou suas combinações de maneiras diferentes, a mortalidade de ambas as espécies não diferiu nessas condições ($P = 0,279$). Finalmente, os três fatores juntos interagiram entre si ($P = 0,008$).

O sexo, o tratamento e a data de tratamento (DAT) podem causar mortalidade individual em *C. capitata*, bem como em *P. concolor* ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Houve interações entre sexo e tratamento para ambas as espécies (*C. capitata* $P = 0,013$; *P. concolor* $P < 0,0001$), mas no caso de *C. capitata*, a mortalidade de machos e fêmeas é semelhante em todas as datas de tratamento ($P = 0,524$), enquanto a mortalidade de *P. concolor* entre os tratamentos foi semelhante para a diferente data do tratamento ($P = 0,103$). Por fim, não houve efeito entre os três fatores que interagem entre eles para qualquer uma das espécies avaliadas (*C. capitata* $P = 1,0$; *P. concolor* $P = 0,369$).

Quando os dados da mortalidade de machos e fêmeas de *C. capitata* foram exibidos separadamente em uma figura para cada tratamento ao longo do tempo (Fig. 2), pode-se observar que os machos, em geral, morreram em proporções maiores do que as fêmeas para todos os tratamentos, o qual foi anteriormente mostrado pela ANOVA de três vias (P (sexo * DAT) = 0,524). A lambda-cialotrina foi mais tóxica (87,5% de mortalidade) do que o Triunvirato (43,3%) e o caulim (35,0%) às 4 h DAT. Quatro dias após o tratamento, a mortalidade causada por *Triunvirato* diminuiu para (20,0%), o de caulim para 25,0%, enquanto a lambda-cialotrina ainda matou mais de 73,7% dos adultos. Além disso, nenhuma mortalidade foi registrada após a liberação de insetos aos 15 dias em diante. A mistura *Triunvirato* + caulim não causou mais

mortalidade do que os dois compostos isolados em nenhuma data do tratamento, portanto nenhum efeito sinérgico foi detectado. Da mesma forma, a mortalidade causada pelo Triunvirato + lambda-cialotrina e lambda-cialotrina isolada não foi substancialmente diferente. Inesperadamente, o caulim em mistura com lambda-cialotrina reduziu a alta mortalidade nas duas primeiras DATs.

A mortalidade de *P. concolor* seguiu, em geral, padrões semelhantes observados nas análises de *C. capitata* com algumas exceções importantes: Triunvirato não matou o parasitoide em qualquer DAT; em geral, as fêmeas parecem ser mais resistentes a todos os tratamentos do que os machos, especialmente para lambda-cialotrina, onde a mortalidade masculina atingiu mais de 80% até 21 DAT (Fig. 3).

Discussão

A seletividade fisiológica apresentada pelo Triunvirato, bem como a ausência de mortalidade do endoparasitoide *P. concolor* constituem resultados satisfatórios, já que, conforme relatado por Ndakidemi et al. (2016), a interação de parasitoides com moléculas tóxicas, de origem botânica ou sintética, podem acarretar, malformação, interrupção do desenvolvimento, redução do número de hospedeiros atacados e dos descendentes produzidos; assim, os nossos resultados sugerem que o bioinseticida, preliminarmente denominado *Triunvirato*, constitui uma alternativa a ser valorada no manejo sustentável de *C. capitata*, visto que, populações dessa praga já desenvolveram resistência aos principais inseticidas sintéticos utilizados para o seu controle (Vontas et al. 2011, Beroiz et al. 2012, Arouri et al. 2014, Elfekih et al. 2014,).

Triunvirato apresentou uma DL_{50} para fêmeas de *C. capitata* de 0,018 μ L/inseto, enquanto a DL_{50} para fêmeas do parasitoide foi estabelecida em 0,045 μ L, sendo, portanto, significativamente mais tóxico para a praga que ao inimigo natural, beneficiando assim o estabelecimento de

programas de manejo da mosca das frutas, através da associação desses métodos sustentáveis de controle, visto que, de acordo com os dados toxicológicos encontrados seria possível associar a aplicação da DL₅₀ do Triunvirato para *C. capitata*, seguida por liberações de *P. concolor*, por exemplo, em cultivos orgânicos, já que, como afirma Isman (2008), essa modalidade de cultivo constitui o melhor mercado para os inseticidas botânicos.

A ausência de efeitos deletérios sobre a ação de parasitismo é um parâmetro estimado em programas de controle de praga, dessa forma, os bioinseticidas demonstram apresentar certa vantagem frente aos inseticidas sintéticos. Zapata *et al.* (2004) evidenciaram que frações de limonóides, obtidos através da extração natural de *Trichilia havanensis* Jacq. (Meliaceae), não causaram mortalidade assim como apresentaram-se inócuos sobre a capacidade benéfica de *P. concolor* submetidos a tratamentos com estes bioinseticidas; de igual modo, Rehman *et al.* (2009) verificaram que o extrato de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) também não foi capaz de afetar a ação de parasitismo de *P. concolor*. Bengochea *et al.* (2012) e Adán *et al.* (2007), demonstraram que outra forma de controle alternativo, o caulim, também se mostrou inócuo a ação de parasitismo realizado por *P. concolor*, onde o produto não foi capaz de interferir no número de hospedeiros atacados e na progênie resultante.

Em contrapartida, Orestes *et al.* (2015) demonstraram que um isolado do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) era incompatível com o controle biológico exercido por *P. concolor*, assim como González & Viñuela (1998) verificaram que o bioinseticida Azadirachtin reduziu seriamente a longevidade do parasitoide, além de interferir negativamente no número de hospedeiros atacados e no tamanho da progênie. A seletividade apresentada por *Triunvirato* o classifica como compatível com *P. concolor*, e, embora o tratamento com 0,048µL (o que corresponde a DL₉₀ para a praga), tenha interferido na capacidade benéfica desse

parasitoide, tratou-se de uma interferência temporária, cujo término deste intervalo de tempo levou ao restabelecimento do número de hospedeiros atacados.

Nas avaliações de semicampo, *Triunvirato* não acarretou mortalidade significativa dos parasitoides em nenhum dos intervalos avaliados. Em contrapartida, foi capaz de matar 43,3 % de *C. capitata* e, após quatro dias de sua aplicação, causou mortalidade de 20% para a espécie praga. Esses resultados reforçam que uma associação do bioinseticida com a ação exercida pelo parasitoide seria viável ao controle sustentável de *C. capitata*, contudo, o entrave da rápida volatilidade, apresentado pelos óleos essenciais, deve ser melhor investigada para que o bioinseticida possa competir, economicamente, com os inseticidas sintéticos. Conforme demonstraram Arancibia *et al.* (2014), óleos essenciais podem ser utilizados, em programas de manejo integrado de pragas, através da inserção deste produto em películas biodegradáveis, aumentando assim a proteção dos frutos, ou, como determina Silva *et al.* (2002), a avaliação das moléculas presentes nos óleos essenciais, podem favorecer o desenvolvimento de inseticidas mais seletivos.

A toxicidade apresentada pelo inseticida sintético Lambda-cialotrina, como esperado, acarretou maior mortalidade e persistência quando comparada a *Triunvirato*, contudo, não apresentou seletividade alguma. Independentemente de sua natureza, a toxicidade de um produto, não deve ser o único parâmetro valorado na escolha do método de controle, visto que até mesmo os bioinseticidas podem acarretar efeitos secundários em organismos não alvos, como os inimigos naturais. Viñuela *et al.* (2001) informaram que Spinosad foi capaz de matar 100% de fêmeas de *P.concolor* 24 horas após aplicação do produto, além de afetar severamente a emergência dos adultos; já Zapata *et al.* (2005) observaram que Piretrinas naturais apresentaram efeito de choque sobre esta mesma espécie benéfica. Tais resultados corroboram a necessidade de se utilizar metodologias mais complexas para que se possa avaliar, fielmente, os efeitos resultantes da

interação do produto não apenas com a praga, mas sim, com todo o sistema praga-inimigo natural envolvido nessa interação.

A avaliação continuada, realizada através de introduções de insetos ao longo de 31 dias de observação foi vantajoso para conhecer alguns aspectos da interação do parasitoide e as moléculas avaliadas em condições além de laboratório, onde as intempéries ambientais são mais similares ao ambiente natural. Além disso, foi possível avaliar a interação dos inseticidas entre si, por exemplo, foi constatado que não houve efeito sinérgico entre caulim e *Triunvirato*, e que a associação de Lambda-cialotrina com *Triunvirato*, não acarretou a seletividade esperada. Por fim, obtivemos informações que somam subsídios ao manejo de *C. capitata*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa PDSE (BEX 7003/15-03) outorgada ao primeiro autor, ao técnico da Universidad Politécnica de Madrid, Luis Quirós, pelo suporte na criação e manutenção dos insetos utilizados nos ensaios, assim como a Celeste Azpiazu, Flor Budia e Sergio Estebanez, por suas contribuições e sugestões neste trabalho.

Literatura Citada

- Adán, A., T. González, R. Bastante, F. Budia, P. Medina, P. Del Estal & E. Viñuela. 2007.** Efectos de diversos insecticidas aplicados en condiciones de laboratorio extendido sobre *Psytalia concolor* (Szèpliget) (Hymenoptera: Braconidae). Bol. San. Veg. Plagas 33: 391-397.
- Alyokhin, A., J. Makatiani & K. Takasu. 2010.** Insecticide odour interference with food-searching behaviour of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) in a laboratory arena. Bio. Sci. Techn. 20: 317 - 329.
- Arancibia, M.Y., M.E. López-Caballero, M.C. Gómez-Guillén & P. Montero. 2014.** Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. Food Control 44: 7-15.

- Baur, M.E & D.J. Boethel. 2003.** Effect of Bt-cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biol. Control* 26: 325-332.
- Benelli, G., G. Flamini, A. Canale, P.L. Cioni & B. Conti. 2012.** Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Prot.* 42: 223-229.
- Bengochea, P., F. Budia, E. Viñuela & P. Medina. 2014.** Are kaolin and copper treatments safe to the olive fruit fly parasitoid *Psytalia concolor*? *J. Pest Sci.* 87: 351-359.
- Beroiz, B., F. Ortego, C. Callejas, P. Hernandez-Crespo, P. Castañera & M.D. Ochando. 2012.** Genetic structure of Spanish populations of *Ceratitis capitata* revealed by RAPD and ISSR markers: implications for resistance management. *Span J. Agric. Res.* 10: 815-825.
- Berta, D.C & M.V. Colomo. 2000.** Dos especies nuevas de *Bracon* F. y primera cita para la Argentina de *Bracon lucileae* Marsh (Hymenoptera: Braconidae), parasitoides de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Insect Mund* 14: 211-219.
- Biondi, AA., L. Zappala, J.D. Stark & N. Desneux. 2013.** Do diopesticides affect the demographic traits of a parasitoid wasp and its biocontrol services through sublethal effects? *PLoS ONE* 8(9): e76548.
- Charleston, D.S., R. Kfir, M. Dicke & L.E.M. Vet. 2005.** Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. *Biol. Control* 33:131-42.
- Cirelli, K.R.N. & A.M. Penteado-Dias. 2003.** Análise da riqueza da fauna de Braconidae (Hymenoptera, Ichneumonoidea) em remanescentes naturais da Área de Proteção Ambiental (APA) de Descalvado, SP. *Rev. Bras. Entomol.* 47: 89-98.
- Delpuech, J.M. & P. Tekinel-Ozalp. 1991.** Epigenetic influences of insecticide on host parasitoid relations. *Redia* 74: 417-24.
- Desneux, N., A. Decourtye & J.M. Delpuech. 2007.** Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- Desneux N., M.H. Pham-Del'egue & L. Kaiser. 2004.** Effects of sublethal and lethal doses of lambda-cyhalothrin on oviposition experience and host searching behavior of a parasitic wasp, *Aphidius ervi*. *Pest Manag. Sci.* 60: 381-89.
- Dey, D. & M.S. Akhtar. 2007.** Diversity of natural enemies of aphids Belonging to Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) in India. *J. Asia-Pacific Entomol.* 10: 281-296.
- Elfekih, S., M. Shannon, J. Haran, & A.P. Vogler. 2014.** Detection of the Acetylcholinesterase Insecticide Resistance Mutation (G328A) in Natural Populations of *Ceratitis capitata*. *J. Econ. Entomol.* 107: 1965-1968.

- González, M. & E. Viñuela. 1998.** Effects of two modern pesticides: azadirachtin and tebufenozide on the parasitoid *Opius concolor*. IOBC/wprs Bull. 20: 233-240.
- Hamm, J.J., D.A. Nordlung & O.G. Marti.1985.** Effects of a Nonoccluded Virus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on the Development of a Parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). Environ. Entomol. 14: 258-261.
- Huber, J.T. 2009.** Biodiversity of Hymenoptera. Cambridge, Wiley-Blackwell, 632p.
- IBM Corp. Released. 2013.** IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0
- Isman, M.B. 2008.** Botanical insecticides: for richer, for poorer. Pest Manag. Sci. 64: 8-11.
- Jacas, J.A. & E. Viñuela. 1994.** Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* (Hym., Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Dip., Tephritidae). Biocontrol Sci. Technol. 4: 147-154.
- MAGRAMA-Ministry of Agriculture, Food and environment. 2016.** Official phytosanitary products entry. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp/> (accessed 10.07.16).
- Marinho, C.F., M.F. Souza-Filho, A. Raga & R.A. Zucchi. 2009.** Parasitóides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Estado de São Paulo: plantas associadas e parasitismo. Neotrop. Entomol. 38: 321-326.
- Matos, A.P., I. Nebo, E.R. Calegari, I.G. Batista-Pereira, P.C. Vieira, J.B. Fernandes, M.F.G.F Silva & R.R. Rodrigues. 2006.** Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia spp.* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. Bioassay, 1: 1-6.
- Matthews, R.W. 1974.** Biology of Braconidae. Annu. Rev. Entomol.19: 15-32.
- Medina, P., J.J. Morales, M. González-Núñez & E. Viñuela. 2008.** Is the use of some selected insecticides compatible with two noctuid endoparasitoids: *Hyposoter didymator* and *Chelonus inanitus*? IOBC/wprs Bulletin 35: 51-59.
- Medina, P., G. Manzanares, R. Izarra, A.A. Del Rio, G. Smagghe & E. Viñuela. 2012.** Influence of insecticide persistence on the survival of the two braconid parasitoids *Chelonus inanitus* and *Aphidius ervi*. IOBC/WPRS Bull. 80: 271-282.
- Morales, J., F. Budia & E. Viñuela. 2004.** Efectos secundários de cinco insecticidas sobre los diferentes estádios de desarrollo del parasitóide *Hyposoter didymator* (Thunberg) (Hymenoptera: Ichneumonidae). Bol. San.Veg.Plagas 30: 773-782, 2004.
- Moreno, J., N. Hawlitzky & R. Jimenez. 1993.** Morphological abnormalities induced by fenoxycarb on the pupa of *Phanerotoma* (*Phanerotoma*) *ocularis* Kohl (Hym., Braconidae). J. Appl. Entomol. 115: 170-175.

- Ndakidemi, B., K. Mtei, & P. A. Ndakidemi. 2016.** Impacts of Synthetic and Botanical Pesticides on Beneficial Insects. *Agric Sci.* 7: 364-372.
- Orestes, M., N. Baser, G. Bubici & E. Tarasco. 2015.** Effect of *Beauveria bassiana* strains on the *Ceratitidis capitata* - *Psytalia concolor* system. *Bull Insectol.* 68(2): 265-272.
- Penagos, D.I., J. Cisneros, O. Hernández & T. Williams. 2005.** Lethal and sublethal effects of the naturally derived insecticide spinosad on parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bio. Sci. Technol.* 15: 81-95.
- Rehman, J.U., X.G. Wang, M.W. Johnson, K.M Daane, G. Jilani, M.A. Khan & F.G. Zalom. 2009.** Effects of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) Seed Extract on the Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) and Its Larval Parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 102: 2233-2240.
- Robertson, J.R., H.K. Preisler & R.M. Russell. 2002.** Polo Plus. Probit and Logit Analysis user's guide, 36.
- Schneider, M. I., G. Smagghe, S. Pineda & E. Viñuela. 2004.** Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biol.Control* 31: 189-198.
- Silva, G., A. Lagunes, J. Rodríguez & D. Rodríguez. 2002.** Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Man. Integ. Plag. Agroecol.* 66: 4-12.
- Statpoint Technologies. 2013.** Statgraphic Centurion XVI (v. 16.2.04). Warrenton, VA, USA.
- Suthisut, D., P.G. Fields & A. Chandrapatya. 2011.** Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two Parasitoids. *J. Stored Prod Res.* 47: 222-230.
- Toscano, L.C. & S.L. Carvalho. 2000.** Parasitismo em *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Anagasta kuhniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) por *Bracon vulgaris* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). *Braz. J. Ecol.* 12: 23-28.
- Triplehorn, C. A. & N. F. Johnson. 2011.** Estudo dos Insetos. São Paulo, Cengage Learning, 809p.
- Viñuela, E., M.P. Medina, M. Schneider, M. González, F. Budia, A. Adán, A. & P. Del Estal. 2001.** Comparison of side-effects of spinosad, tebufenozide and azadirachtin on the predators *Chrysoperla carnea* and *Podisus maculiventris* and the parasitoids *Opius concolor* and *Hyposoter didymator* under laboratory conditions. *IOBC/WPRS Bull.* 24: 25-34.
- Volpe, H.X.L., S.A De Bertoli, G.O. Magalhães, A.L. Gobi, A.C Varella, R.A. Polanczyk. 2011.** Interação de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* e *Cotesia flavipes* no controle de *Diatraea saccharalis*. *Cad. Agroecol.* 6: 1-5.

- Vontas, J., P. Hernández-Crespo, J.T. Margaritopoulos, F. Ortego, H.T. Feng, K.D. Mathiopoulos & J.C. Hsu. 2011.** Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100: 199 -205.
- Zapata, N., P. Medina, E. Viñuela & F. Budia. 2005.** Toxicidad de malation, pimetrocina, piretrinas naturales+PBO y triflumuron en adultos del parasitoide *Psytalia concolor* (Szepligeti) (Hym.: Braconidae) según el modo de aplicación. *Bol San Veg Plagas.* 31:111-118.
- Zapata, N., P. Medina, M. Gonzalez, F. Budia, B. Rodríguez & E. Viñuela. 2004.** Toxicidad de azadirona y 1,7+ 3,7-di-O-acetilhanansina (4:1) sobre adultos de *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hym.: Braconidae). *Bol. Sanid. Veg. Plagas* 30: 783-789.
- Zikic, V., C.V. Achterberg, S.S. Stankovic & M. Ilic. 2011.** The male genitalia in the subfamily Agathidinae (Hymenoptera: Braconidae): morphological information above species on generic level. *Zool. Anzeig.* 250: 246 - 257.

Tabela 1. Dose letal 50% (LD₅₀) resultante da interação do *Triunvirato* com adultos recém emergidos de *P. concolor* (N = 20) avaliados 72 horas após aplicação tópica na região protorácica.

Toxicidade de <i>Triunvirato</i> sobre adultos de <i>Psytalia concolor</i>					
		μL/parasitoide (95% LC)	Inclinação ± SE	χ ²	G.L.
<i>Triunvirato</i>	♂	0,044 (0,040 - 0,048)	5,426 ± 0,720	4,917	6
	♀	0,045 (0,041 - 0,049)	8,301 ± 1,162	6,796	6

LC: Limites de confiança.

Tabela 2. Interação entre fatores resultantes dos tratamentos: Triunvirato (1,8%), Lambda-cialotrina (0,13%), Caulim (50 kg/ha) e suas combinações binárias; avaliados sobre machos e fêmeas de *Psytalia concolor* e *Ceratitis capitata* em condições de semicampo.

Fator	Entre espécies		
	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>
Espécies (<i>S</i>)	2,940	1	0,087
Tratamento (<i>T</i>)	150,759	6	< 0,0001
Data (<i>D</i>)	61,081	5	< 0,0001
<i>S * T</i>	13,685	6	< 0,0001
<i>S * D</i>	1,263	5	0,279
<i>T * D</i>	4,372	24	< 0,0001
<i>S * T * D</i>	1,987	19	0,008
<i>Ceratitis capitata</i>			
	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>
Sexo (<i>S</i>)	23,678	1	< 0,0001
Tratamento (<i>T</i>)	77,100	6	< 0,0001
Data (<i>D</i>)	45,645	5	< 0,0001
<i>S * T</i>	2,788	6	0,013
<i>S * D</i>	0,838	5	0,524
<i>T * D</i>	5,261	21	< 0,0001
<i>S * T * D</i>	0,270	21	1,000
<i>Psytalia concolor</i>			
	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>
Sexo (<i>S</i>)	139,513	6	< 0,0001
Tratamento (<i>T</i>)	81,973	1	< 0,0001
Data (<i>D</i>)	38,818	5	< 0,0001
<i>S * T</i>	5,373	6	< 0,0001
<i>S * D</i>	3,827	22	< 0,0001
<i>T * D</i>	1,860	5	0,103
<i>S * T * D</i>	1,082	22	0,369

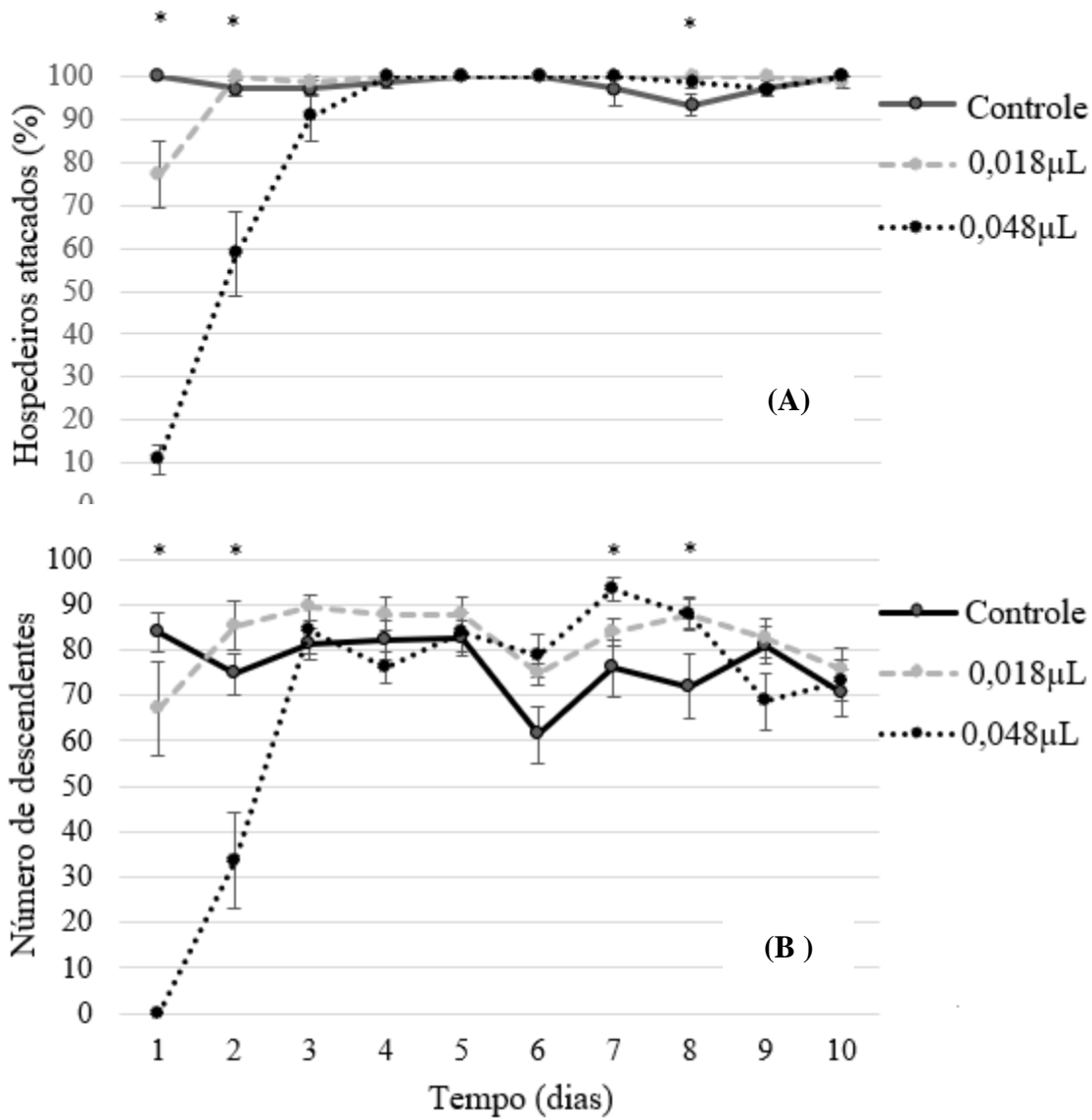


Figura 1. Porcentagem de hospedeiros atacados (A) e progênie (B) resultantes do parasitismo de *Psytalia concolor* após exposição ao inseticida botânico *Triunvirato*. Avaliação contínua, durante 10 dias, e sob condições de laboratório (Temperatura: 20 ± 2 °C, umidade relativa: 65 ± 5 % e fotoperíodo: 16 h. luz/8 h escuro).

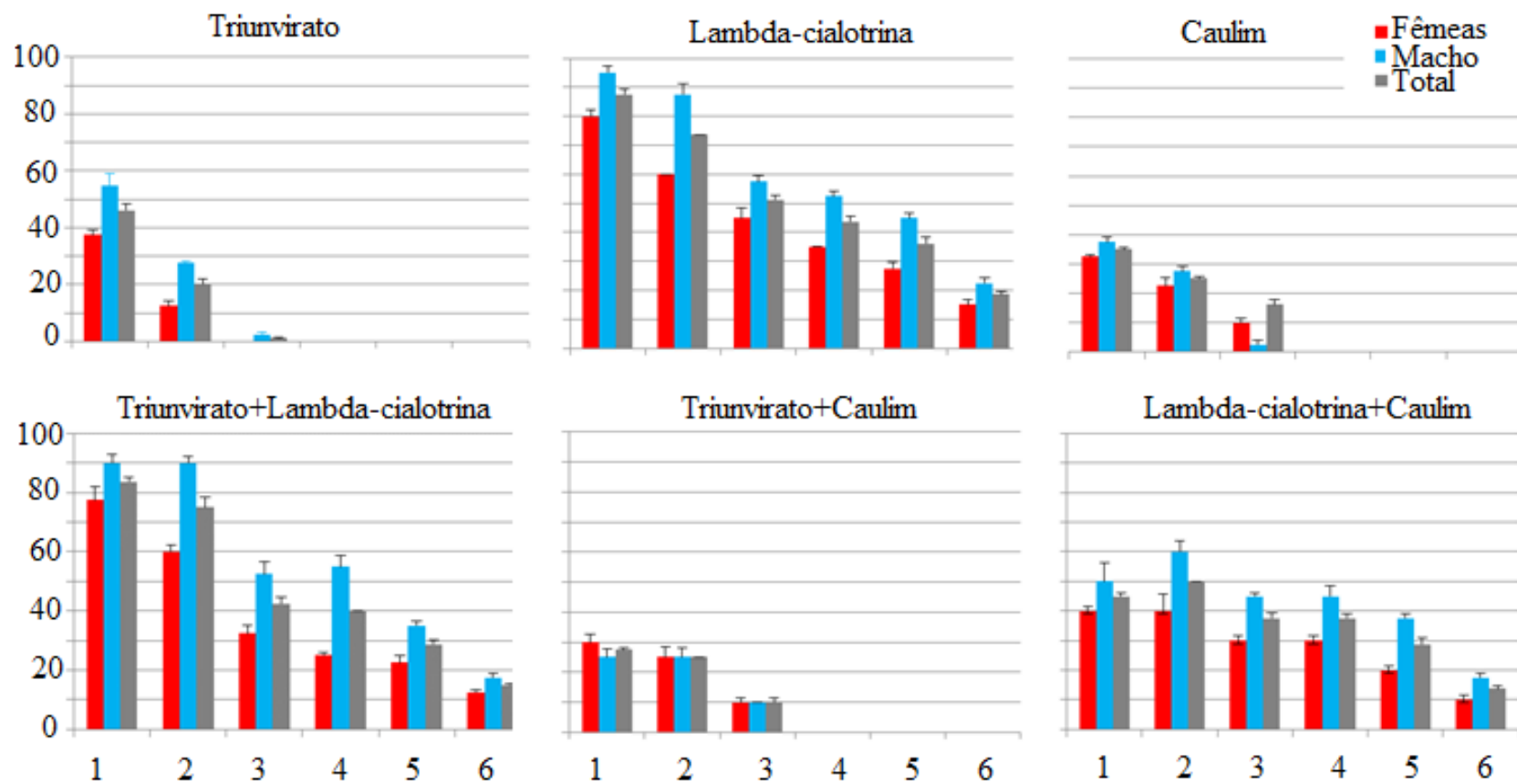


Figura 2. Efeito letal de *Triunvirato* (4,8 %), *Lambda-cialotrina* (0,13 %), *Caulim* (50 kg / ha) e suas combinações sobre adultos *Ceratitis capitata* expostos a laranjeiras tratadas em condições de semicampo. Médias \pm padrão corrigidas seguindo a fórmula de Schneider-Orelli.

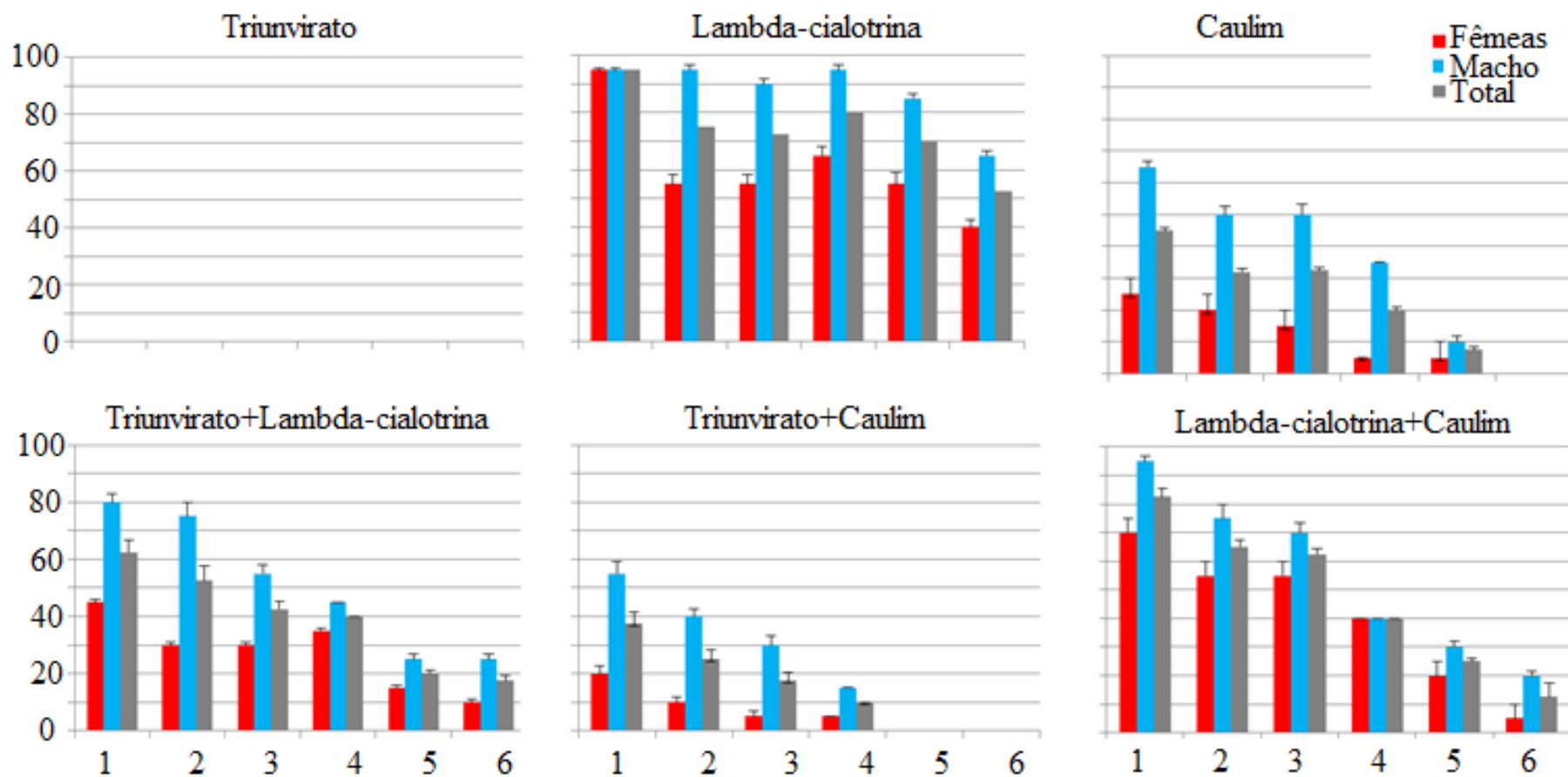


Figura 3. Efeito letal de *Triunvirato* (4,8 %), lambda-cialotrina (0,13%), Caulim (50 kg/ha) e suas combinações sobre adultos de *Psyttalia concolor* expostos a laranjeiras tratadas em condições de semicampo. Médias \pm padrão corrigidas seguindo a fórmula de Schneider-Orelli.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Se a natureza levou milhões de anos para aprimorar seus mecanismos, por que não os copiar? A partir desta premissa, avaliamos e discutimos as possibilidades de inserir novos insumos bioinseticidas na atual guerra armamentista contra algumas pragas de importância agrícolas, cujo desenvolvimento de resistência aos principais inseticidas sintéticos utilizados para o seu controle, tem se apresentado como o principal entrave à expansão da produtividade agrícola. As toxinas, de origem botânica e animal, poderão representar fontes promissoras ao desenvolvimento de inseticidas mais seletivos e ecologicamente viáveis, para tanto, se faz necessário que pesquisas, como a que desenvolvemos, sejam cada dia mais constante e incentivadas.