

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DE  
PESTICIDAS SOBRE PARASITÓIDES DE OVOS**

GABRIELA DE AZAMBUJA SILVA MIRANDA

DOURADOS-MS  
(OUTUBRO/2010)

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DE  
PESTICIDAS SOBRE PARASITÓIDES DE OVOS**

GABRIELA DE AZAMBUJA SILVA MIRANDA

Orientador: Paulo Eduardo Degrande  
Co-orientador: Marcos Gino Fernandes

DOURADOS-MS  
(OUTUBRO/2010)

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DE  
PESTICIDAS SOBRE PARASITÓIDES DE OVOS**

GABRIELA DE AZAMBUJA SILVA MIRANDA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para a obtenção do título de Mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

DOURADOS-MS  
(OUTUBRO/2010)

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

632.95 M672p	<p>Miranda, Gabriela de Azambuja Silva Padronização de metodologia para avaliar a seletividade de pesticidas sobre parasitóides de ovos. / Gabriela de Azambuja Silva Miranda. – Dourados, MS : UFGD, 2010. 31f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Pesticidas – Controle biológico. 2. Pesticidas - Técnicas e métodos . I. Título.</p>
-----------------	--

**“PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DE  
PESTICIDAS SOBRE PARASITÓIDES DE OVOS”**

Por

GABRIELA DE AZAMBUJA SILVA MIRANDA

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD,  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE  
Área de concentração: Entomologia

---

Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes  
Co- Orientador – UFGD

---

Prof. Dr. Eraldo Rodrigues de Lima  
Professor – UFV

---

Prof. Dr. Fabrício Fegundes Pereira  
Professor - UFGD

---

Dr. Harley Nonato de Oliveira  
Membro Titular Embrapa

**A Deus,**

por me guiar e nunca me deixar desistir .

**Aos meus pais Eliza e Leo,**

pelo apoio incondicional, dedicação e incentivo.

**Ao meu esposo Felipe e minha filha Sara**

por todo amor, paciência e compreensão.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Grande Dourados, pelas instalações e toda infra-estrutura cedida para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande, pelos ensinar <sup>vii</sup>, pela paciência e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Fabrício Fagundes Pereira, pelos ensinamentos e estímulo para continuar tentando.

Ao Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes, por entender minhas limitações e se propor a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Eraldo Rodrigues de Lima, por ter aceitado meu convite e vindo de tão longe para enriquecer minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Elmo Pontes de Melo, pelas valiosas sugestões na participação de minha qualificação.

Ao Dr. Antonio Panizzi e a Dra. Beatriz Corrêa-Ferreira, pesquisadores da EMBRAPA-SOJA, pelo fornecimento das espécies utilizadas nessa dissertação e pelas valiosas contribuições sobre como melhor criá-las em laboratório.

Aos colegas do Mestrado em Entomologia, pela convivência.

À amiga, Elizangela Leite Vargas Grance, pelo exemplo de caráter, profissionalismo e competência. E também pelas risadas, ensinamentos e amizade verdadeira.

Às amigas Ana Beatriz Rigueti Zanardo e Maria da Graça Cardoso Pereira, pelos momentos compartilhados, conhecimentos divididos e amizade

Ao amigo Miguel Ferreira Soria, pela luta diária na tentativa de criar os percevejos, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, além da inestimável ajuda nos momentos que não pude estar presente.

Aos amigos Everton Kodama, Cássio Kodama e Thiago Moreira Azambuja pela preciosa ajuda na criação dos percevejos e preparo dos vasos, pelas valiosas dicas, e principalmente pelo exemplo de humildade, prestatividade e educação.

Aos demais membros da equipe do Laboratório de Entomologia Aplicada, pelos bate-papos, amizade e auxílio na condução dos experimentos.

À amiga Rosália Azambuja, pela companhia na criação dos percevejos, auxílio na condução dos experimentos e pelas divertidas e estimulantes conversas.

À técnica Janete Greff de Lima pela inestimável colaboração e amizade.

À secretária de Pós-Graduação Leiza Inara Vargas pela atenção e serviços prestados.

As amigas Pricila Pesqueira de Souza e Paulla Correia Barbosa por me acolherem com tanto carinho em suas casas quando precisei ficar em Dourados.

À querida amiga Gersina Centurião e sua filha Mônica Centurião por cuidar com tanto carinho de minha filha durante a minha ausência.

A todos de minha família, pelo incentivo, pelas conversas e por sempre me estimularem.

À querida tia Lenita Oliveira, pelas risadas, brincadeiras e por todas as vezes que me socorreu como babá.

Ao meu pai Leo Renato Miranda, minha irmã Renata de Azambuja Silva Miranda, avó Zulmira Azambuja Silva e cunhado Rômulo Ueno pelo apoio, incentivo e preciosa colaboração.

A minha filha Sara Miranda Mosca, que veio para dar sentido a minha vida, pelo carinho, pelo comportamento maravilhoso, mesmo com todas as minhas ausências, pela inspiração e pelo sorriso que desfaz qualquer preocupação.

A minha mãe, Eliza Azambuja Silva Miranda, meu anjo da guarda, pelo amor, incentivo e paciência, pela colaboração para o término dos experimentos, por todas as vezes que deixou a própria vida de lado para me atender, por cuidar com tanta dedicação e carinho da Sara nas tantas vezes que me fiz ausente, e principalmente pelo exemplo de mãe, mulher e pessoa.

Ao meu amor, Felipe Bezerra Mosca, pela enorme paciência, pelo apoio e compreensão, pelo companheirismo e carinho, por me ajudar a não peder o foco, e pelas tantas vezes que ficou com nossa pequena filhinha para que eu pudesse finalizar esse trabalho

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, minha infinita gratidão.

## SUMÁRIO

LISTA DE APÊNDICES .....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1 ORIGEM DE <i>E. heros</i> e <i>T. podisi</i> .....	6
3.2 CRIAÇÃO DE <i>E. heros</i> E <i>T. podisi</i> .....	7
3.3 CRITÉRIOS DA IOBC PARA O DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PADRONIZADAS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO ESTENDIDO (STERK et al., 1999).....	8
3.4 MODO DE EXPOSIÇÃO DOS PARASITÓIDES AOS RESÍDUOS DOS PESTICIDAS – SISTEMA “ASPECLE”.....	8
3.4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA ASPECLE.....	9
3.4.1.1 GAIOLAS DE CONTATO DOS PARASITÓIDES COM OS PESTICIDAS.....	9
3.4.1.2 SISTEMA DE VENTILAÇÃO.....	11
3.5 TESTES PRÉVIOS.....	11
3.5.1 ADEQUABILIDADE SISTEMA DE VENTILAÇÃO.....	11
3.5.2 INTRODUÇÃO DOS PARASITÓIDES NA GAIOLA.....	12
<b>3.5.2.1 Com auxílio de tubos de emergência.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5.2.2 Com auxílio de pincel.....</b>	<b>13</b>
3.6 DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	14
3.6.1 PESTICIDAS-TESTE.....	14
3.6.2 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	15
3.6.3 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3.6.4 TRATAMENTOS, PARCELAS E REPETIÇÕES.....	17
3.6.5 AVALIAÇÕES.....	18
<b>3.6.5.1 Mortalidade.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6.5.2 Capacidade de parasitismo.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6.5.3 Análises estatísticas.....</b>	<b>19</b>

<b>3.6.5.4 Critérios para a validação da metodologia.....</b>	<b>19</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
4.1 TESTES PRÉVIOS.....	19
4.1.1 SISTEMA DE VENTILAÇÃO.....	19
4.1.2 INTRODUÇÃO DOS PARASITÓIDES NA GAIOLA.....	20
4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	21
5 CONCLUSÕES.....	26
6 AGRADECIMENTOS.....	26
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

## LISTA DE APÊNDICES

<b>Apêndice 1</b> - Sistema de ventilação: bomba de vácuo, tubo central mangueiras conectadas às gaiolas de contato.....	33
<b>Apêndice 2</b> - Sistema de ventilação: conexão do tubo central com a bomba de vácuo.....	34
<b>Apêndice 3</b> - Sistema de ventilação: detalhe da conexão das gaiolas com o tubo central.....	35
<b>Apêndice 4</b> - Visão em detalhe da conexão entre o tubo principal e a bomba de vácuo.....	36
<b>Apêndice 5</b> - Detalhe dos tubos de emergência conectados às gaiolas (com e sem a capa de papel cartão).....	37
<b>Apêndice 6</b> - Gaiolas contendo folhas tratadas, e conectadas ao sistema de ventilação.....	38
<b>Apêndice 7</b> - Cartões contendo os ovos a serem ofertados para as fêmeas de <i>T. podisi</i> .....	39
<b>Apêndice 8</b> - Cartão com ovos do hospedeiro sendo parasitados dentro da gaiola.....	40
<b>Apêndice 9</b> - Placas de Petri contendo as cartelas com ovos parasitados por <i>T. podisi</i> durante o experimento.....	41
<b>Apêndice 10</b> - Detalhe das cartelas contendo ovos parasitados durante experimento.....	42

## RESUMO

A identificação de pesticidas seletivos a organismos benéficos é uma medida de extrema importância, pois permite a compatibilização dos métodos de controle químico e biológico, além da seleção de produtos adequados para o uso em programas de manejo integrado de pragas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia experimental padronizada para avaliar a seletividade de pesticidas sobre parasitóides de ovos em condições de laboratório estendido (exposição dos parasitóides a resíduos frescos e secos presentes em folhas sob condições experimentais controladas). O parasitóide utilizado no presente trabalho foi *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae), principal parasitóide de ovos do percevejo-marrom-da-soja *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). A metodologia foi desenvolvida de acordo com as premissas do grupo de trabalho “Pesticidas e Organismos Benéficos” da Organização Internacional de Controle Biológico e Integrado de Plantas e Animais Nocivos (IOBC) para testes de laboratório estendido. Os tratamentos testados na validação do método foram: água (controle negativo), paration metílico/Mentox 600 CE (controle positivo) e lufenuron/Match 50 CE (substância teste). Os tratamentos foram pulverizados sobre plantas de soja acondicionadas em vasos até o ponto de escoamento, na mais alta dosagem recomendada para o tratamento e questão na cultura da soja. Após duas horas, folhas foram retiradas das plantas e acondicionadas em bandejas. Depois, essas folhas foram inseridas em gaiolas (cilindros de vidro de 25 cm comp. X 3,5 cm de diâmetro) até que a superfície inferior do cilindro ficasse totalmente coberta. Essas gaiolas foram conectadas a um sistema de ventilação, com a função de impedir o acúmulo de gases tóxicos em seu interior. Então, dez fêmeas de 24 h de idade foram introduzidas em cada gaiola e deixadas em contato com os tratamentos por 24 h. Após esse período, os tratamentos foram observados para a contagem dos sobreviventes. Nos tratamentos onde haviam sobreviventes foi oferecida uma cartela/repetição com ovos de *Eushistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) na densidade de 40 ovos/fêmea. Após 24 h, outra cartela com 400 ovos foi inserida em cada gaiola, mas dessa vez deixada por 48 h. Após esse período o experimento foi desmontado, e as cartelas com ovos foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido. Os ovos parasitados foram contados entre 8 e 9

dias após a introdução dos cartões na gaiola, e com esses dados calculou-se a capacidade de parasitismo (número de ovos parasitados/fêmeas) em cada tratamento. Esses dados permitiram estimar a redução na capacidade de parasitismo e enquadrar os pesticidas testados em uma das três categorias de avaliação propostas pela IOBC para este tipo de teste: N = inócuo ou levemente tóxico (redução 0-50%), M = moderadamente tóxico (redução de 51-75%), T = tóxico (redução > 75%). Foram avaliadas também a emergência (%) e razão sexual dos descendentes. Foram realizadas 10 repetições/tratamento. Os resultados obtidos estiveram de acordo com o esperado e cumpriram os critérios estabelecidos para a validação da metodologia, sendo que os resíduos frescos do controle positivo mostraram-se altamente tóxicos, causando 100% de mortalidade nas fêmeas adultas de todas as repetições, fato que comprovou o contato dos parasitóides com as folhas tratadas. A mortalidade (%), eficiência de parasitismo, longevidade e razão sexual da testemunha se mostraram compatíveis com dados encontrados na literatura sobre a biologia de *T. podisi*, indicando que ela não afeta negativamente os parasitóides. A metodologia mostrou-se prática, fácil de ser conduzida e atendeu a todos os critérios para sua validação, sendo considerada adequada para testar os efeitos de pesticidas sobre *T. podisi* em condições de laboratório estendido.

## ABSTRACT

The identification of selective pesticides to beneficial organisms is a measure of extreme importance, since it allows the matching methods of chemical and biological control in addition to selecting the appropriate product for use in programs of integrated pest management. The objective of this study was to develop a standardized methodology to evaluate the selectivity of pesticides to egg parasitoids under laboratory extended conditions (parasitoids exposure to fresh and dried residues found on leaves under controlled experimental conditions). *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae), major parasitoids of the brown stink bug of soil, *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), was the egg parasitoid chosen to be tested in the present work. The method was developed according to the assumptions of the "Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms' of The International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC) for laboratory extended tests. The treatments evaluated were: water (negative control), methyl parathion/Mentox 600 EC (positive control) and lufenuron (tested pesticide). They were spread on pesticide free soil plants contained in pots under greenhouse conditions until its run-off point (in the highest agronomic recommended dosage). After two hours, the leaves were removed and placed in separate trays for each treatment. Then, these leaves were placed in cages (glass cylinders of 25 cm length X 3,5 cm de diameter), at the same amount, until the bottom surface of the cylinder was completely covered. Then, they were connected on a ventilation system, whose function was to ventilate the cages and prevent the buildup of toxic gases. Each cage was considered a single repeat. So, ten 24 h old female were put in each cage and let there for 24 hours. After this period, the survivors present in each treatment were counted. In those treatments with survivors, a card with 400 eggs of *Eushistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) were offered. After 24 h, another card with 400 eggs were offered and let there for 48 hours. Then, the bioassay was dismantled, and the cards with eggs were placed on Petri dishes with moisture filter paper. The parasitized eggs were counted 8 to 9 days after the introduction of the cards in the cage, and with these data the parasitism capacity of each treatment was obtained. So, the parasitism capacity reduction was estimated and the pesticides were placed in one of the three categories established by IOBC for this kind of test: N = harmless or slightly harmful (Reduction 0-50%), M = moderately harmful

(Reduction 51-75%), and T = harmful (Reduction > 75%). The emergency (%) and sex ratio was evaluated to. The results agreed with the expected and fulfilled the validation criteria for the validation of methodology. The positive control fresh residues of were highly toxic, causing 100% mortality in adults females of all repeats, fact that proved the contact of the parasitoids with treated leaves. The control mortality (%), longevity and sex ratio were compatible with previous data about *T. podisi* biology found in literature, indicating that it doesn't negatively affects the parasitoids. The methodology proved to be practical, easy to be led and attended all the criteria for validation, being considered appropriate to test the effects of pesticides in *T. podisi* at extended laboratory conditions.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Parasitóides e predadores de pragas agrícolas são responsáveis por grande parte da redução da população de seus hospedeiros ou presas, contribuindo para limitar os danos causados pelas pragas, prevenir surtos, além de manter as pragas secundárias abaixo do nível de dano econômico. A manutenção desses inimigos naturais é indispensável como fator de equilíbrio no agroecossistema, minimizando a necessidade de intervenção do homem no controle de pragas. Entretanto, na agricultura atual, são poucas as situações em que o controle biológico natural consegue controlar a praga sem a complementação de inseticidas (DEGRANDE et al., 2002). Portanto, pesticidas seletivos que possam ser usados no controle de pragas, sem afetar adversamente importantes inimigos naturais devem ser incentivados.

Para manejar a interação entre o controle químico e biológico é necessário conhecer as formas de seletividade e as condições de uso de um inseticida, visando reduzir ou eliminar o seu impacto sobre os inimigos naturais. A seletividade pode ser definida como a propriedade que um produto fitossanitário apresenta de controlar a praga visada com o menor impacto possível sobre seus inimigos naturais e pode ser alcançada em função das diferenças fisiológicas e ecológicas existentes entre os organismos (DEGRANDE et al., 2002).

A seletividade ecológica é caracterizada em função das diferenças de comportamento e habitat entre pragas e inimigos naturais, possibilitando que o produto químico entre em contato com determinada espécie e não com outras (RIPPER et al., 1951). Ela pode ser obtida, principalmente pelo modo de aplicação do produto, como horário onde a praga é mais ativa, direcionamento do jato, aplicação em faixas ou reboleiras etc (PEDIGO, 1988; DEGRANDE et al., 2002). Já a seletividade fisiológica é inerente ao produto, estando diretamente relacionada a maior tolerância de determinado inimigo natural ou polinizador em relação a praga, quando se encontra sob a ação dele. Essa seletividade pode ser alcançada por meio da redução de absorção do produto químico através do tegumento ou pelo aumento na degradação da substância tóxica pelo sistema enzimático do inimigo natural (PEDIGO, 1988; DEGRANDE et al., 2002).

Com o objetivo de elaborar metodologias padronizadas para testar a seletividade de produtos fitossanitários a organismos benéficos e selecionar pesticidas adequados para o uso em Programas de MIP, a “Organização Internacional de Controle Biológico e Integrado de Plantas e Animais Nocivos, West Palearctic Section (IOBC/WPRS)” criou, em 1974, o “Grupo de Trabalho Pesticidas e Organismos Benéficos” (HASSAN, 1992, 1997; ZHANG & HASSAN, 2000). O desenvolvimento de métodos experimentais padronizados, de curto, médio e longo prazos para avaliar a seletividade de pesticidas a organismos benéficos é muito importante, pois permite o intercâmbio de resultados de um país a outro, economiza o gasto com a repetição de testes e melhor possibilita a reprodutibilidade dos resultados.

Entre as recomendações desse Grupo destacam-se: 1) que o controle biológico seja considerado para o controle de qualquer praga-alvo, particularmente em áreas ambientalmente sensíveis; 2) que, existindo controle biológico, este seja aumentado por manejo adequado tanto do campo quanto dos habitantes naturais; 3) que seja assegurado suporte adequado a todas as disciplinas básicas para o desenvolvimento de soluções no controle biológico, enfatizando sistemática, implementação de novas tecnologias e técnicas de avaliação; 4) que o controle biológico seja melhor documentado; entre outras (AESCHLIMANN, 1997).

De acordo com Hassan (1989), o grupo tem desempenhado as seguintes atividades: a) desenvolver padrões metodológicos de laboratório, semi-campo e campo para testes de efeitos secundários de pesticidas em organismos benéficos, de acordo com os princípios aprovados internacionalmente; b) organizar programações internacionais conjuntas para testar o efeito secundário de pesticidas de interesse geral; c) estabelecer uma cadeia de testes de laboratório para organismos benéficos nos países membros da IOBC, para uso contínuo e atualização dos métodos; d) dar suporte e desenvolver pesquisas com inimigos naturais resistentes a pesticidas; e) dar parecer na seleção de produtos seletivos para uso no manejo integrado.

Cada um dos membros do Grupo de Trabalho desenvolve métodos experimentais com um inimigo natural, submetendo-o ao Grupo para análise (HASSAN, 1994). A classificação é dada para o nome comercial do pesticida, uma vez que um mesmo ingrediente ativo pode apresentar-se comercialmente em diferentes formulações, misturas e concentrações que poderiam ter impacto

diferenciado sobre os organismos benéficos. Diversos aspectos têm sido considerados na seleção das espécies. Na prática, devem ser selecionadas espécies fáceis de serem criadas (acessibilidade) e representativas (relevantes) dentre as espécies que ocorrem na cultura que o pesticida é utilizado.

Reconhecendo que nenhum método sozinho é capaz de prover informações suficientes sobre os efeitos de um pesticida sobre um inimigo natural, uma combinação de testes que incluem laboratório, semi campo e campo é recomendada pelo grupo de trabalho da IOBC/WPRS (HASSAN et al., 1985).

A sequência de testes desenvolvida pelo IOBC/WPRS (HASSAN et al., 1985; BOLLER et al., 2005) se inicia com: (a) teste de laboratório (teste de “pior caso de toxicidade”) com o estágio de vida mais vulnerável do inseto, expondo a espécie ao máximo contato com a mais elevada dosagem agrônômica recomendada para o pesticida. Este teste tem a função de submeter o inseto à prova de inocuidade (ausência de toxicidade), separando os produtos inócuos dos poucos nocivos. Se ele for inócuo, os testes param por aí. Caso seja nocivo, testes de laboratório adicionais se tornam necessários; (b) teste de laboratório com estágios de vida menos susceptíveis (aplicação dos produtos com o parasitóide ainda no hospedeiro), visando a diferenciação entre os preparados nocivos; (c) duração da atividade danosa, com a função de estimar o risco, analisar a persistência do pesticida; (d) teste de laboratório estendido (exposição do adulto a resíduos do pesticida aplicado nas folhas da planta em condições laboratoriais controladas); (e) semi-campo (similar ao teste de laboratório estendido, mas com o experimento montado em condições reais de campo, na época do ano apropriada para a avaliação do pesticida; (f) campo (campos diretamente pulverizados com os produtos após a liberação de organismos criados em laboratório).

A grande maioria dos métodos padronizados existentes para testar o efeito de inseticidas a organismos benéficos foi desenvolvido para testes em condição de laboratório, sendo um dos principais propósitos da IOBC intensificar o desenvolvimento de outras metodologias padronizadas de testes, como semi-campo, campo e laboratório estendido (HASSAN et al, 2000). Este último tem a função de ajudar a estimar o dano dos pesticidas aos organismos benéficos em condições simuladas de campo (STERK et al., 1999) e acaba se tornando uma grande ferramenta de previsão, pois ao mesmo tempo em que cria uma situação

semelhante ao que acontece no campo, mantém a praticidade de um trabalho de laboratório.

Todos os tipos de testes (laboratório, semi-campo e campo) devem conter características básicas nas quais os pesquisadores devem se basear para realizar os experimentos (STERK et al., 1999). Nos experimentos de laboratório isso significa expor os adultos dos parasitóides a depósitos frescos de pesticidas aplicados sobre placas de vidro (estágio de vida mais susceptível), ou pulverizar diretamente os organismos ou substratos, no caso dos estágios de vida menos susceptíveis (HASSAN et al., 2000). Nestes testes os pesticidas são enquadrados em quatro classes preconizadas pela IOBC (HASSAN E DEGRANDE, 1996), sendo: classe 1 = inócuo ou não tóxico ( $< 30\%$  de redução na capacidade de parasitismo), 2 = ligeiramente tóxico ( $30\% \leq 79\%$  de redução na capacidade de parasitismo) 3 = moderadamente tóxico ( $80\% \leq 99\%$  de redução na capacidade de parasitismo) e 4 = tóxico ( $> 99\%$  de redução na capacidade de parasitismo).

Já nos testes de laboratório estendido, os adultos do parasitóide devem ser expostos a depósitos do pesticida aplicados em folha, simulando a degradação que ocorre em campo, sobre condições controladas de temperatura e umidade. Nestes testes os pesticidas são enquadrados em três categorias de avaliação (BOLLER et al., 2005): N = inócuo ou levemente tóxico (redução 0-50%), M = moderadamente tóxico (redução de 51-75%), T = tóxico (redução  $> 75\%$ ).

No Brasil, estudos de seletividade vêm sendo objetos de discussão (DEGRANDE & GOMES, 1990), no entanto, não existe nenhum acordo nacional de uniformização de metodologias ou padronização de procedimentos para avaliar os efeitos colaterais de pesticidas sobre organismos benéficos. Em geral, a totalidade das metodologias utilizadas nos trabalhos é oriunda da criatividade e dos critérios individuais dos próprios pesquisadores (DEGRANDE, 1996).

Atualmente, o número de trabalhos que têm se baseado nas metodologias padronizadas pela IOBC vem crescendo, o que indica um aumento na preocupação e conscientização por parte dos pesquisadores da importância desses testes. Esses trabalhos, em sua maioria, são realizados em culturas onde o MIP e a Produção Integrada (PI) já são uma realidade, fato que torna imprescindível o conhecimento de quais inseticidas são tóxicos aos organismos benéficos. A fruticultura é um bom exemplo de cultura onde a PI está se estabelecendo, o que pode ser notado na grande quantidade de artigos sobre seletividade de pesticidas

que vêm sendo publicados sobre maçã (MANZONI et al., 2006; MANZONI et al., 2007), pêssigo (GIOLO et al., 2005; GIOLO et al., 2007), uva (MORANDI-FILHO et al., 2006), entre outras frutas, principalmente envolvendo o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Também é crescente o número de trabalhos sobre seletividade de pesticidas em culturas como tomate (PINHO-MOURA et al., 2005), algodão (CZEPAQ et al., 2005) e soja, pois eles são importantes no estabelecimento de listas de produtos indicados para o MIP dessas espécies.

A maioria dos trabalhos de seletividade visa elucidar o efeito de pesticidas aos inimigos naturais conhecidos como parasitóides, principalmente os parasitóides de ovos. Esses inimigos naturais têm por característica atuar apenas na fase de ovo, sendo considerados um dos mais importantes agentes de controle biológico. Isso se deve ao fato do seu controle ocorrer antes que a praga provoque qualquer tipo de dano a planta e também porque várias espécies de parasitóides de ovos já tem tecnologia de criação massal desenvolvida, estando disponíveis comercialmente e podendo ser liberadas de forma inundativa no campo, atuando como verdadeiros “inseticidas biológicos”.

*Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae), é um parasitóide de ovos de vários percevejos da família Pentatomidae, sendo o percevejo-marrom-da-soja *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) seu hospedeiro preferencial (PACHECO & CORRÊA-FERREIRA, 1998, 2000; GODOY & ÁVILA, 2000; GODOY et al., 2005a). Esse sugador é uma das principais pragas da soja, sendo encontrado em elevadas populações nessa cultura e causando danos desde a formação de vagens até o final do desenvolvimento das sementes (PANIZZi, 1991).

Em áreas onde o uso de inseticidas para o controle de *E. heros* é feito de maneira criteriosa, a contribuição de *T. podisi* na sua mortalidade é muito elevada, chegando a 94% (GODOY et al., 2005a). Isso indica que a preservação desses agentes nas lavouras de soja, pelo uso adequado de produtos químicos seletivos, é fator primordial no estabelecimento de um programa de MIP-Soja, pois possibilita que esses inimigos naturais atuem com maior eficiência na regulação dessa praga (CORSO & CORREA-FERREIRA, 1994).

## 2 OBJETIVOS

Desenvolver uma metodologia padronizada para avaliar os efeitos de pesticidas sobre parasitóides de ovos (utilizando a espécie *Telenomus podisi* como modelo) em condições de laboratório estendido, baseada nos critérios do “Grupo de Trabalho Pesticidas e Organismos Benéficos” da IOBC/WPRS.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos consistiram no desenvolvimento de uma metodologia padronizada seguindo as recomendações da *International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)* (HASSAN, 1992) para avaliar o impacto de pesticidas sobre os inimigos naturais, e foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Aplicada na Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD entre 1 de março de 2010 a 1 de setembro de 2010. Os bioensaios foram subdivididos em testes prévios, visando descobrir uma forma prática e eficiente de exposição dos parasitóides aos resíduos de pesticidas e validação da metodologia, teste da metodologia em si, desenvolvida a partir dos testes prévios.

### 3.1 ORIGEM DE *E. heros* e *T. podisi*

As populações iniciais de *E. heros* e *T. podisi* foram fornecidas pela Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), localizada nos arredores do município de Londrina - PR, gentilmente cedidas pelo Dr. Antônio Panizzi e pela Dra. Beatriz Correa-Ferreira, respectivamente. Eventualmente, adultos e ninfas de *E. heros* foram coletados nos campos experimentais do Laboratório de Biotecnologia e Entomologia Aplicada da UFGD sendo introduzidos (após quarentena) à criação.

### 3.2 CRIAÇÃO DE *E. heros* E *T. podisi*

Colônias de *E. heros* foram mantidas em sala climatizada como fonte contínua de ovos, seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (2008). Os ovos foram coletados diariamente, sendo uma parte utilizada para dar continuidade à criação dos percevejos, outra para criar os parasitóides, e a grande maioria conservada a  $-17^{\circ}\text{C}$  (no freezer) por no máximo dois meses, para posterior utilização nos bioensaios.

Para a multiplicação, adultos de *T. podisi* foram criados em cilindros de vidro transparentes de 25 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro, mantidos em sala climatizada (Temperatura:  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , UR:  $70 \pm 20\%$ , Fotofase: 14h). O cilindro teve uma de suas extremidades fechadas com voil e a outra com rolha, permitindo aeração adequada dentro do tubo. A água foi fornecida através de algodões umedecidos. O alimento fornecido foi mel, disponibilizado em estreitos filetes (feitos com agulha de insulina) na face superior do interior do tubo (esse procedimento evitou que os parasitóides ficassem aderidos ao mel no momento da alimentação).

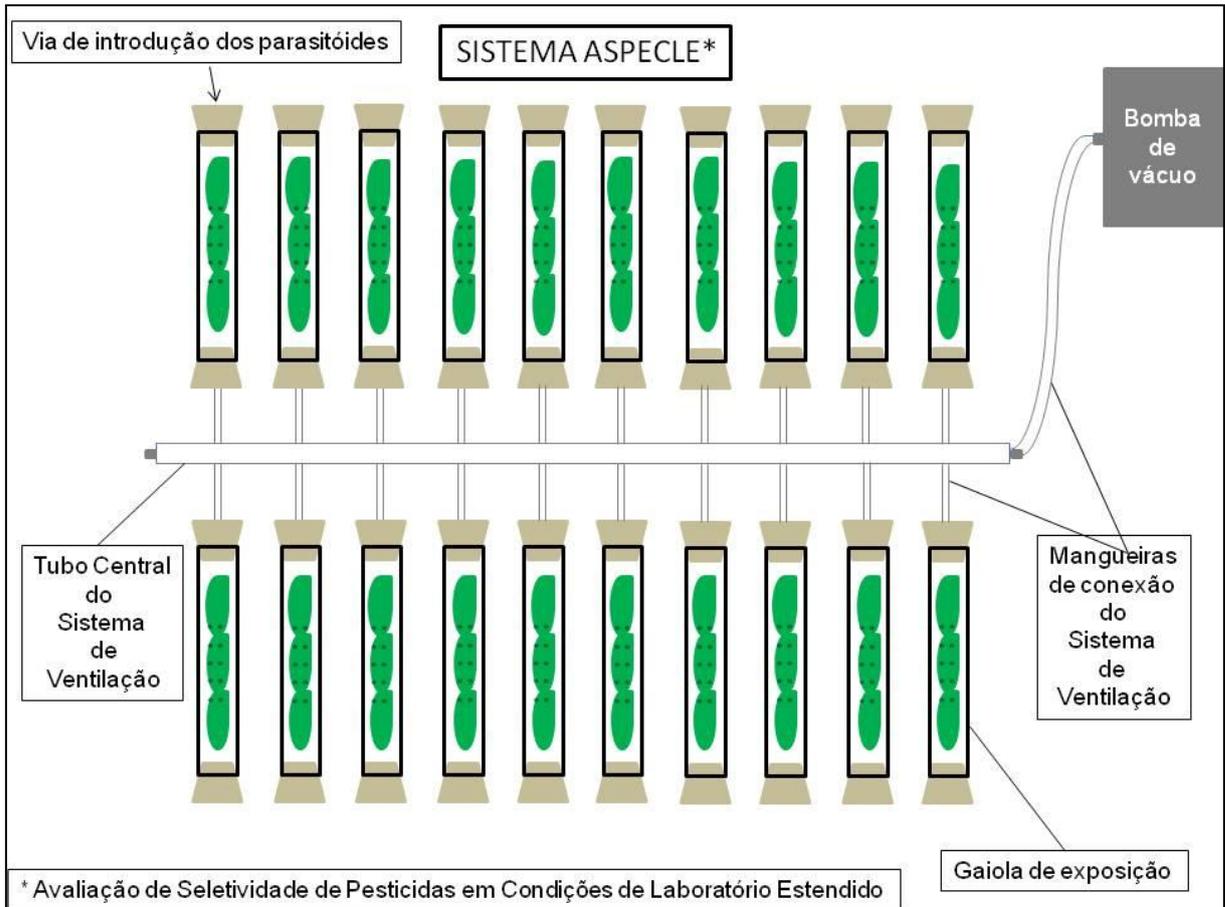
As matrizes, massas de ovos de *E. heros* parasitados por *T. podisi*, foram introduzidas nos cilindros um a dois dias antes da emergência dos adultos. Dois dias após a eclosão dos parasitóides (tempo suficiente para emergência e cópula, uma vez que as fêmeas emergem um a dois dias após os machos) ovos frescos (de um a três dias de idade) de *E. heros* foram oferecidos para parasitismo. A proporção utilizada foi de 20 ovos por fêmea. As massas de ovos de *E. heros* foram expostas aos parasitóides por 24 horas. Após esse período, elas foram retiradas dos frascos de multiplicação e uma nova massa foi ofertada. Após esses dois dias, as matrizes foram descartadas. Então, as massas já parasitadas foram acondicionadas em placas de Petri até um a dois dias antes da emergência dos parasitóides. Esses por sua vez parasitaram nova massa de ovos dando continuidade à criação.

### 3.3 CRITÉRIOS DA IOBC PARA O DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PADRONIZADAS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO ESTENDIDO (STERK et al., 1999)

1. Exposição do organismo a depósitos do pesticida aplicados em folha, simulando a degradação que ocorre em campo, sobre condições controladas (flutuação de temperatura, umidade do ar e luminosidade simulando um dia de verão); 2. Utilizar o estágio de vida mais susceptível do organismo testado; 3. Proporcionar ventilação adequada e troca de ar para prevenir a acumulação de gases do pesticida; 4. Espécies apresentando idade uniforme; 5. Pulverização na máxima concentração recomendada do pesticida até o ponto de escorrimento; 6. Aplicação de acordo com as boas práticas agrícolas; 7. Período adequado de exposição antes da avaliação; 8. Controle negativo (tratado com água) e controle positivo (padrão tóxico) para cada experimento; 9. Avaliação da redução da capacidade benéfica (parasitismo, emergência, razão sexual etc) além da mortalidade. 10. Três categorias de avaliação (BOLLER et al., 2005): N = inócuo ou levemente tóxico (redução 0-50%), M = moderadamente tóxico (redução de 51-75%), T = tóxico (redução > 75%)

### 3.4 MODO DE EXPOSIÇÃO DOS PARASITÓIDES AOS RESÍDUOS DOS PESTICIDAS – SISTEMA “ASPECLE”

Foi desenvolvido um sistema para a exposição dos parasitóides aos resíduos dos pesticidas. Esse sistema é uma inovação desse trabalho, e foi denominado de “Sistema Aspecle - Avaliação da Seletividade de Pesticidas em Condições de Laboratório Estendido”. Esse sistema consistiu de um conjunto de gaiolas (para a exposição dos parasitóides aos resíduos dos pesticidas contidos em folhas) conectadas entre si por um sistema de ventilação cuja função foi de impedir o acúmulo de gases tóxicos no interior das gaiolas (Figura 1).



**Figura 1:** Desenho esquemático do sistema desenvolvido para expor os parasitóides aos resíduos de pesticidas e avaliar a seletividade desses produtos a eles.

### 3.4.1 DESCRIÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA ASPECLE

#### 3.4.1.1 GAIOLAS DE EXPOSIÇÃO DOS PARASITÓIDES AOS PESTICIDAS

As gaiolas foram uma das inovações dessa metodologia, sendo cada uma constituída de:

- 1 cilindro de vidro transparente de 25,0 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro (Figura 2).

- 2 rolhas de cortiça para vedar as extremidades do cilindro. Uma delas contendo perfuração central (mediante furadeira) de aproximadamente 0,6 cm de diâmetro para conectar a mangueira do sistema de ventilação, e a outra, contendo perfuração central de 1,0 cm de diâmetro para conectar o tubo de infestação ou colocar o algodão umedecido para fornecimento de umidade (Figura 2).

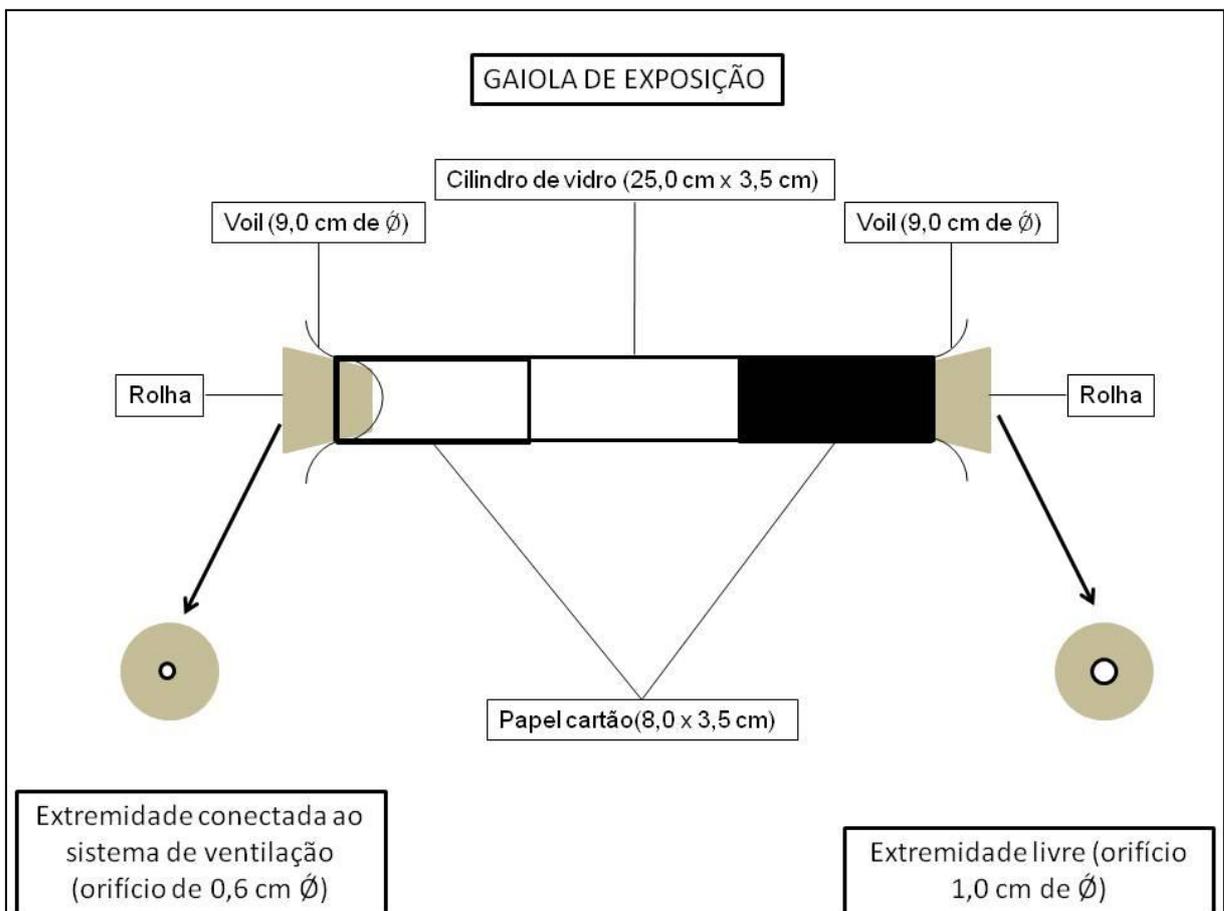
- 2 círculos de 9,0 cm de diâmetro de tecido do tipo voil. Colocados entre a rolha e o cilindro, pois foi observado durante os testes que os parasitóides

entravam nos orifícios das rolhas e conseguiam escapar quando estas eram desconectadas do tubo para a oferta de ovos (Figura 2).

- 2 cilindros de 8,0 cm comprimento e 3,6 cm de diâmetro, feitos de papel cartão escuro. Eles foram sobrepostos em cada extremidade da gaiola com o objetivo de fazer os parasitóides se concentrarem no centro desta, facilitando a oferta de ovos, que foi feita inserindo-se a cartela contendo os ovos hospedeiros através da extremidade não conectada ao tubo de ventilação. Com os parasitóides localizados mais ao centro, o risco de escape foi diminuído (Figura 2).

- Filetes de mel (aplicados mediante agulha de insulina) foram ofertados como alimento.

- As gaiolas ficaram apoiadas em suportes de madeira para impedir que se movimentassem. O suporte proporcionou uma disposição em que cada gaiola ficou 5,0 cm de distância da outra (Figura 1).



**Figura 2:** Gaiola de exposição dos parasitóides aos resíduos dos pesticidas.

### 3.4.1.2 SISTEMA DE VENTILAÇÃO

Um sistema de ventilação para a eliminação de gases do interior das gaiolas foi desenvolvido (Apêndice 1). Ele foi constituído de:

- 1 bomba de vácuo (Aspirador/Compressor Mod 089/Cal Fanen®), cuja função foi aspirar aos gases tóxicos de dentro da gaiola.

- 1 tubo central de PVC de (2,2 cm de diâmetro), responsável por distribuir a aspiração da bomba de vácuo entre as gaiolas. - 1 mangueira de 1,0 cm de diâmetro, utilizada para conectar a bomba de vácuo ao tubo de PVC.

- Várias mangueiras de 0,5 cm de diâmetro x 13 cm comprimento, responsáveis por conectar as gaiolas ao tubo de PVC.

Uma das extremidades do tubo de PVC foi vedada e a outra recebeu um engate rápido para conectar a mangueira de 1,0 cm de diâmetro ao bico aspirador de ar da bomba de vácuo (Apêndice 2). Também foram feitas perfurações laterais espelhadas (a cada 5,0 cm de distância), o que possibilitou a conexão das gaiolas nos dois lados do tubo (Apêndice 3). Essas perfurações também receberam engate rápido, utilizado para facilitar a conexão e desconexão das mangueiras de 0,5 cm de diâmetro ao tubo central.

## 3.5 TESTES PRÉVIOS

### 3.5.1 ADEQUABILIDADE DO SISTEMA DE VENTILAÇÃO

Um bioensaio com dois tratamentos e cinco repetições foi desenvolvido, com o objetivo de avaliar se o sistema seria prejudicial aos parasitóides. Cinco gaiolas contendo aproximadamente 15 indivíduos foram conectadas ao sistema de ventilação, e outras cinco gaiolas (com a mesma quantidade de indivíduos) foram deixadas com ventilação natural. A mortalidade dos indivíduos foi avaliada 24 horas após a conexão. A capacidade de parasitismo das fêmeas foi avaliada pela oferta de 150 ovos/gaiola após 24 h do início do experimento.

### 3.5.2 INTRODUÇÃO DOS PARASITÓIDES NA GAIOLA

#### 3.5.2.1 Com auxílio de tubos de emergência

Testou-se a introdução dos parasitóides nas gaiolas de contato através de uma adaptação dos tubos de emergência utilizados em testes de laboratório com o parasitóide de ovos *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Esse método de introdução foi desenvolvido por Hassan (1992), sendo utilizado em diversos testes de seletividade desde então.

Cada tubo de emergência foi constituído por um tubo com tampa (tipo coleta sanguínea) de 8 cm de comprimento x 1 cm de diâmetro. Sua extremidade fechada foi cortada com estilete a aproximadamente 1,5 cm do final, diminuindo seu tamanho para  $\pm$  6,5 cm de comprimento. Essa é a extremidade que ficou voltada para dentro da gaiola de contato e, portanto, foi através dela que os parasitóides alcançaram o seu interior. A outra extremidade (com tampa) foi utilizada para a inserção das cartelas contendo as matrizes (Apêndice 4). Em cada tampa foi feito um furo central para permitir o fluxo de ar.

Uma cartela (cartolina) de 2 cm de comprimento x 1 cm de largura contendo 15 ovos foi inserida em cada tubo alguns dias antes da emergência dos parasitóides. Uma vez que a tampa dos tubos continha um orifício, foi colocada uma tira de voil entre eles para impedir a fuga dos parasitóides. A outra extremidade do tubo foi vedada com outra tira de voil amarrada por elástico. Um dia (24 h) após a emergência dos primeiros parasitóides, os tubos foram conectados nas gaiolas de contato (através da rolha contendo o orifício central de 1 cm de diâmetro) (Apêndice 5). Depois, os tubos foram escurecidos com papel cartão preto para estimular a entrada dos parasitóides, que atraídos pela luz, se dirigiram para o interior das gaiolas iluminadas.

Os tubos foram desconectados e desencapados 24 horas após o início do experimento e ficaram acondicionados em sala climatizada até a emergência de todos os parasitóides remanescentes. O cálculo da população inicial se deu pelo exame do tubo de emergência. Todos os ovos de *E. heros* parasitados (que tornaram-se pretos) foram contados e o número de adultos remanescentes no tubo

foi subtraído. Em função da razão sexual da população utilizada, foi determinado o número total de fêmeas. As contagens foram feitas em microscópio estereoscópico.

Foram testados 10 tubos de emergência. Os dados obtidos com a análise destes tubos (população inicial e razão sexual) foram comparados com os dados obtidos pela contagem e sexagem dos parasitóides presentes em cada gaiola após o término do experimento. Essa comparação foi importante, pois permitiu verificar a proximidade destes dados, ou seja, se o número de fêmeas estimado com análise do tubo de emergência foi igual ao número de fêmeas que realmente se encontravam nas gaiolas. Para que esse método fosse considerado adequado os dados deviam ser exatamente os mesmos, pois como a população inicial se derivou de apenas 15 ovos parasitados, qualquer diferença no número de fêmeas acarretaria em erro no cálculo da capacidade de parasitismo, e conseqüentemente na avaliação dos efeitos do produto testado.

### **3.5.2.2 Com auxílio de pincel**

Cartelas contendo aproximadamente 20 ovos frescos de *E. heros* foram ofertadas a 1 fêmea acasalada de *T. podisi* (um a dois dias de idade), e posteriormente acondicionadas individualmente em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido. Dois a três dias antes da emergência dos parasitóides essas cartelas foram transferidas individualmente para cilindros de vidro idênticos às gaiolas de contato.

Um dia (24 h) após a emergência dos primeiros parasitóides, foi feita a sexagem dos adultos presentes em cada tubo mediante análise de suas antenas. Foram deixadas 10 fêmeas/tubo, sendo os parasitóides excedentes, mortos ou retirados do mesmo com ajuda de pincel. Os tubos contendo as fêmeas foram então encaixados (de baixo para cima) na gaiola de contato, e esperou-se que os parasitóides, por apresentarem geotropismo negativo, seguissem para o tubo de cima. Quando necessário, foi utilizado pincel com o intuito de facilitar a entrada dos parasitóides na gaiola.

As fêmeas de *T. podisi* foram deixadas dentro dos tubos por quatro dias. Foi oferecido mel (em filetes na parte superior de dentro do tubo) e água (algodão umedecido inserido no orifício maior da rolha) aos parasitóides. Esse método tem

uma vantagem em relação ao anterior, pois o número exato de fêmeas introduzidas na gaiola é conhecido previamente, não havendo necessidade de analisar as gaiolas após o término do experimento.

Dez gaiolas foram montadas, e a praticidade na execução desse método foi analisada através do tempo gasto para a introdução das fêmeas em cada gaiola e da avaliação da mortalidade das mesmas, pois o pincel poderia tê-las danificado.

### 3.6 DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

#### 3.6.1 PESTICIDAS-TESTE

As formulações comerciais dos inseticidas paration metílico (Mentox® 600 BR CE) e lufenuron (Match® 50 EC) foram testadas na máxima dosagem recomendada para a cultura da soja (Tabela 1). Paration metílico foi considerado a testemunha positiva por ser altamente tóxico e pouco seletivo a pragas e inimigos naturais, sendo utilizado como testemunha positiva em diversos testes de seletividade. Seu modo de ação se dá por contato e ingestão, ou seja, a praga ou inimigo natural precisam entrar em contato com ele ou ingerir algum alimento tratado para serem afetados. Assim, um resultado de 100% de mortalidade comprova que todos os parasitóides presentes na gaiola entraram em contato com o pesticida por tempo suficiente para ele fazer efeito. Lufenuron foi o pesticida escolhido para testar a metodologia, pois é sabidamente inócuo a adultos, uma vez que atua como inibidor da síntese de quitina, matando imaturos na ecdise.

**Tabela 1-** Pesticidas utilizados na cultura da soja (AGROFIT) e avaliados nos testes de toxicidade inicial a adultos de *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae), após preparados para um volume de calda de 200L ha-1.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Fabricante	Grupo químico	Modo de ação	DI <sup>1</sup>
Lufenuron	Match 50 EC	Syngenta	Benzoiluréia	Ingestão	7,5
Paration Metílico	Mentox 600 CE	Prentiss Química	Organofosforado	Contato e Ingestão	600,0

<sup>1</sup>DI = Dosagem do ingrediente ativo em g ha-1 ou g 200L-1;

### 3.6.2 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Vasos (7 kg) contendo duas plantas/soja cada (livre de pesticidas) foram mantidos em casa de vegetação e irrigados dia sim dia não, servindo como fonte de folhas para os testes realizados.

De preferência, as plantas pulverizadas devem estar entre o final da fase vegetativa e o início do enchimento das sementes, pois é nesse período que as folhas são maiores e mais verdes, demorando mais a ressecar e cobrindo melhor a superfície da gaiola.

Os pesticidas em teste, na concentração indicada (a mais elevada concentração para a cultura) foram aplicados nas plantas até o ponto de escorrimento. As aplicações foram feitas na mesma distância em todos os tratamentos (aproximadamente 50 cm), cuidando para que a calda cobrisse tanto a face abaxial quanto adaxial das folhas. Os tratamentos foram aplicados em ordem crescente de toxicidade, sendo pulverizada primeiramente a testemunha negativa (água), depois lufenuron, e por último paration metílico. Após o término de cada aplicação, o pulverizador (manual de pressão acumulada - Brudden Pratical 2000®) foi lavado abundantemente com água, depois com uma sequência de água + detergente e álcool por três vezes, e novamente enxaguado abundantemente com água.

Aproximadamente duas horas após a aplicação (período de secagem da calda nas plantas), as folhas foram retiradas dos vasos e acondicionadas em bandejas etiquetadas, para posterior introdução nas gaiolas de contato. Esta etapa também foi feita em ordem crescente de toxicidade, sendo primeiramente retiradas as folhas tratadas com água, depois com lufenuron e por último as tratadas com paration metílico. Esse cuidado evitou a contaminação das amostras menos tóxicas pelas mais tóxicas.

### 3.6.3 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi iniciado 24 horas após a emergência dos primeiros parasitóides destinados a população inicial. Isso porque os machos emergem um a dois dias antes das fêmeas. Portanto, este intervalo para o início do experimento é

necessário para que haja tempo suficiente para as primeiras fêmeas emergirem e copularem com os machos.

Primeiro, aplicou-se os tratamentos sobre as plantas contidas nos vasos em casa de vegetação. Quando o filme pesticida presente nas folhas secou, elas foram retiradas das plantas e acondicionadas em bandejas (item 3.6.2). Para que as folhas aderissem melhor à gaiola, tiras de fita dupla-face (aproximadamente 1,0 cm de largura) foram cortadas e pregadas no interior das gaiolas. Então, as folhas tratadas, em tamanho e quantidade semelhantes, foram selecionadas e coladas sobre as fitas, de modo que toda essa parte da gaiola ficasse coberta por folhas. Tomou-se cuidado para que as folhas cobrissem totalmente as fitas, evitando assim a aderência (e morte) dos parasitóides. Esse procedimento evitou que as folhas se amontoassem em uma das extremidades do tubo quando os parasitóides da população inicial foram introduzidos no mesmo.

Então, vedou-se uma das extremidades da gaiola com o voil e com a rolha contendo o orifício de 0,6 cm de diâmetro. A outra extremidade foi utilizada para a introdução dos parasitóides. Esta introdução se deu com auxílio de pincel (item 3.5.2.2), sendo a população inicial constituída de 10 fêmeas / gaiola.

Após a introdução, a gaiola foi vedada com o voil e a rolha com o orifício de 1,0 cm de diâmetro. Nesse orifício foi introduzido algodão umedecido, responsável pelo fornecimento de água e umidade aos parasitóides. Então, a gaiola foi imediatamente conectada a mangueira do sistema de ventilação (Apêndice 6).

As gaiolas foram mantidas em sala climatizada (Temperatura:  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , UR:  $70 \pm 20\%$ , Fotofase: 14 horas).

As fêmeas foram deixadas em contato com os resíduos presentes nas folhas por 24 horas. Após este período, a mortalidade dos parasitóides foi avaliada, e cartelas contendo ovos de *E. heros* foram introduzidas nas gaiolas que continham fêmeas sobreviventes.

Os ovos que foram ofertados ao parasitismo se encontravam conservados no freezer a um mês. Seu descongelamento se deu pela retirada do freezer e acondicionamento em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido, por 1,5 h. Esse procedimento diminui o ressecamento dos ovos. Após esse período, os ovos foram aderidos (cola bastão) em cartelas de 3,0 cm x 3,0 cm na quantidade de 40 ovos/fêmeas, ou seja, aproximadamente 400 ovos/cartela (Apêndice 7).

Uma cartela foi ofertada 24 h após o início do experimento (2<sup>o</sup> dia) (Apêndice 8) e outra após 48 h (3<sup>o</sup> dia). Portanto, foram ofertados 800 ovos/gaiola (80 ovos/fêmeas) durante todo o experimento. Esse número foi baseado nos estudos de Pacheco & Corrêa-Ferreira (1998) e Foerster & Nakama (2002), onde a média de ovos parasitados/fêmea durante os primeiros cinco dias foi de  $\pm 75$  e  $\pm 37$  ovos respectivamente. Portanto, o número de ovos oferecido foi suficiente para avaliar a capacidade de parasitismo de *T. podisi*.

A introdução das cartelas foi feita pela extremidade não conectada ao sistema de ventilação (retirando-se a rolha e colocando a cartela rapidamente para evitar o escape das fêmeas), e se deu com a ajuda de uma pinça de cabo longo. O experimento foi desmontado no 5<sup>o</sup> dia (96 horas após seu início), pois constatou-se em experimentos prévios e literatura (PACHECO & CORRÊA-FERREIRA, 1998; FOERSTER & NAKAMA, 2002) que esse é o período onde ocorrem os maiores índices de parasitismo.

Após esse período, o experimento foi finalizado e as gaiolas desconectadas. As cartelas contendo os ovos parasitados foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido e mantidas em sala climatizada, nas mesmas condições do experimento, até que a contagem dos ovos parasitados fosse possível (Apêndice 9 e 10).

#### 3.6.4 TRATAMENTOS, PARCELAS E REPETIÇÕES

Foram testados 3 tratamentos: água (testemunha negativa), Mentox 600 CE (testemunha positiva), e Match CE (substância teste).

Os experimentos foram realizados em duas etapas (uma vez que não havia gaiolas suficientes para testar as 30 repetições de uma vez), sendo realizadas 5 repetições/tratamento em cada uma das etapas.

Cada parcela consistiu de uma (1) gaiola de contato contendo folhas tratadas e 10 fêmeas adultas do parasitóide.

O delineamento foi casualizado em blocos (DBC), sendo que cada etapa foi considerada um bloco, com 5 repetições/tratamento.

### 3.6.5 AVALIAÇÕES

#### 3.6.5.1 Mortalidade

O número de parasitóide mortos/repetição foi verificado 24 h após o início do experimento. Como este é um teste para avaliar a toxicidade inicial dos pesticidas sobre os parasitóides, avaliações posteriores não foram necessárias.

#### 3.6.5.2 Capacidade de parasitismo

O número de ovos hospedeiros parasitados em cada tratamento foi contado com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os ovos foram contados entre 8 e 9 dias após a introdução do cartão na gaiola, pois no decorrer deste tempo aqueles que foram parasitados se tornaram pretos, e deste modo foram facilmente distinguíveis dos não parasitados (amarelos transparentes).

Com o número de ovos hospedeiros parasitados em cada tratamento, e com os dados do número de fêmeas/tratamento foi possível determinar a eficiência de parasitismo (número de ovos parasitados/fêmeas).

A redução na capacidade de parasitismo das fêmeas submetidas aos pesticidas foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$R = \left(1 - \left(\frac{P}{P}\right)\right) * 100$$

em que:  $R$  = porcentagem de redução da capacidade de parasitismo

$P$  = valor do parasitismo médio para cada produto

$P$  = parasitismo médio observado para o tratamento testemunha.

De acordo com os resultados obtidos os produtos foram enquadrados em três categorias de avaliação N = inócuo ou levemente tóxico (redução 0-50%), M = moderadamente tóxico (redução de 51-75%), T = tóxico (redução > 75%) (BOLLER et al., 2005).

### **3.6.5.3 Análises estatísticas**

Em todos os experimentos as porcentagens de mortalidade foram corrigidas usando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925). Os dados referentes a eficiência de parasitismo, % emergência e razão sexual foram analisados por análise de variância (ANOVA). Não foi necessário utilizar teste de médias, pois a análise de variância foi conclusiva.

### **3.6.5.4 Critérios para a validação da metodologia**

A testemunha positiva deve eliminar mais de 99% (classe IV) dos parasitóides presentes no tubo, pois isto provará que os parasitóides ficam em contato com os resíduos do pesticida (neste caso presentes nas folhas) tempo suficiente para serem afetados por ele. A porcentagem de mortalidade na testemunha negativa não deve exceder 30%, pois isso indicaria que a metodologia em si afeta negativamente o parasitóide. Os dados sobre a capacidade benéfica gerados pela testemunha devem estar de acordo com aqueles presentes na literatura. A metodologia deve ser prática e fácil de ser reproduzida (BARRET et al., 1994).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 TESTES PRÉVIOS**

#### **4.1.1 SISTEMA DE VENTILAÇÃO**

O sistema de ventilação desenvolvido se mostrou eficiente para a eliminação dos gases do interior da gaiola e não prejudicou os parasitóides.

A mortalidade das fêmeas presentes nas gaiolas conectadas ao sistema de ventilação não ultrapassou 5% e a taxa de parasitismo foi de 93% nas gaiolas conectadas e de 94,4% nas gaiolas desconectadas. Isso evidenciou que o sistema

não prejudica os parasitóides, sendo considerado adequado para testes de seletividade em condições de laboratório estendido.

#### 4.1.2 INTRODUÇÃO DOS PARASITÓIDES NA GAIOLA

Os tubos de emergência não se mostraram uma boa opção como via de introdução da população inicial em testes de seletividade com *T. podisi*, pois a população inicial estimada através da análise do tubo se mostrou bem diferente da população inicial encontrada dentro das gaiolas de contato.

Essa diferença ocorreu provavelmente devido a fuga de parasitóides quando o tubo foi introduzido ou retirado da gaiola, e/ou devido ao descolamento e perda de ovos aderidos na cartela no momento da conexão dos tubos com a gaiola. Esses fatos demonstraram a falta de praticidade no momento da conexão dos tubos com as gaiolas, o que acabou por acarretar as diferenças nos números estimados e reais da população inicial.

Uma vez que o número de fêmeas presentes/tubo não ultrapassou 11 indivíduos, qualquer diferença da realidade acarretaria em uma má interpretação dos dados sobre a eficiência de parasitismo. O fato de não se saber o número exato de indivíduos colocados dentro da gaiola da gaiola, também impediu a contagem exata dos mesmos para avaliar a mortalidade.

Portanto, mesmo esse método tendo se baseado no método padronizado pela IOBC para testes laboratoriais de seletividade com a espécie *Trichogramma*, ele não se mostrou eficiente para o presente trabalho. Isso se deu porque nos testes com *Trichogramma* o número de indivíduos da população inicial geralmente é maior que 100 (DEGRANDE, 1996; ROCHA & CARVALHO, 2004; GIOLO et al., 2005; MORANDI FILHO et al., 2006), o que faz com que pequenas diferenças na estimativa do número de fêmeas não cause diferenças significativas no cálculo da taxa de parasitismo. Nos testes com *T. podisi*, esse número de população é impraticável, pois acarretaria na oferta de um número enorme de ovos para parasitismo, o que não se justifica, pois ao contrário de *Trichogramma*, onde a estimativa do número de ovos é feita por área, em *T. podisi* as massas são coladas uma a uma e devem ser contadas, o que tornaria o método muito trabalhoso e nada prático.

Já a introdução de fêmeas adultas com o auxílio de pincel se mostrou um método prático e fácil de ser executado, sendo então o mais indicado para os testes de seletividade com *T. podisi*. Este método sanou todos os problemas encontrados no método de introdução anterior, uma vez que o número de fêmeas presentes em cada gaiola foi conhecido previamente, possibilitando uma interpretação confiável da eficiência de parasitismo. Ele também não foi agressivo ao parasitóide visto, que apenas 6 (4%) das 150 fêmeas introduzidas na gaiola estavam mortas no dia seguinte a infestação, mortalidade essa considerada dentro da normalidade, uma vez que na própria criação do parasitóide observou-se que a mortalidade nos primeiros 5 dias de vida variou entre 0 a 13%.

#### 4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

As gaiolas contendo folhas tratadas com paration metílico apresentaram 100% de mortalidade de fêmeas em todas as repetições. Esse resultado comprova que todos os parasitóides presentes na gaiola entraram em contato com o pesticida por tempo suficiente para ele fazer efeito. Esse é um dos critérios para a validação da metodologia, e comprovou a eficiência do equipamento desenvolvido em proporcionar o contato dos parasitóides com os resíduos pesticidas.

A testemunha negativa (água) apresentou apenas 5% de mortalidade um dia após o início do experimento. Isso comprova que a metodologia desenvolvida não afeta negativamente os parasitóides, e proporciona um ambiente favorável para a avaliação dos efeitos de pesticidas sobre *T. podisi*.

Lufenuron mostrou não afetar os adultos de *T. podisi* expostos a seus resíduos frescos e secos em folhas de soja, sendo a mortalidade destes calculada em 3,16% (corrigida pela fórmula de ABBOTT, 1925). Esse resultado está de acordo com esperado e também é um dos indícios da confiabilidade dessa metodologia. Haseeb et al. (2000) chegaram a resultados similares avaliando o efeito do contato de outros inibidores da síntese de quitina (chlorfluazuron/Atabron EC, flufenoxuron/Cascade EC e teflubenzuron/Nomolt EC) ao parasitóide *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Esse resultado também foi compatível com o encontrado em diversos trabalhos sobre o efeito de inseticidas inibidores da síntese de quitina na sobrevivência de adultos do gênero

*Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (CONSOLI et al., 2001; CAÑETE, 2005; GIOLO et al., 2007; MORANDI FILHO et al., 2008).

A capacidade de parasitismo das fêmeas de *T. podisi* na testemunha foi de 40,49 ovos durante os 5 dias de experimento (Tabela 2). Esse resultado é compatível com o encontrado por Foerster & Nakama (2002), que chegaram a uma média de 37 ovos parasitados/fêmea de *T. podisi* também nos primeiros 5 dias de vida. Já, Pacheco & Corrêa-Ferreira (1998) observaram médias maiores de parasitismo (aproximadamente 75 ovos/fêmeas) no mesmo período. A causa da diferença entre estes trabalhos não fica muito clara, uma vez que a metodologia utilizada foi a mesma. Entretanto, entre o presente trabalho e o desenvolvido por Pacheco & Corrêa-Ferreira (1998) ela pode ter ocorrido devido ao fato dos ovos ofertados ao parasitismo neste, terem sido mantidos em congelador por cerca de 2 meses. Essa conservação em baixas temperaturas acabou por diminuir a aceitação dos ovos pelas fêmeas de *T. podisi*, principalmente por causa do ressecamento no momento do seu descongelamento, quando cerca de 30% dos ovos apresentaram-se ressecados. Assim, dos 80 ovos oferecidos/fêmea apenas 56 se encontravam em condições de parasitismo. Esse problema ocorre com todos os ovos de *E. heros* conservados em baixas temperaturas, mas parece ser menor quando a armazenagem é feita em geladeira (1 mês) ou nitrogênio líquido (1 ano). Portanto, em experimentos de seletividade deve-se dar preferência a ovos frescos, mantidos em geladeira ou nitrogênio líquido.

Houve aproximadamente 83,3% de emergência na testemunha negativa (Tabela 2), resultado compatível com o encontrado por Peres & Corrêa-Ferreira (2004), que testando uma metodologia para aprimorar a criação de *T. podisi* em ovos de *E. heros* observaram aproximadamente 86% de emergência. Já Nakama & Foerster (2001) observaram 98,6% de emergência de *T. podisi* em ovos de *E. heros*. A provável explicação para essas diferenças é que tanto no experimento conduzido por Peres & Corrêa-Ferreira (2004) quanto no presente trabalho foram utilizados ovos conservados em baixas temperaturas, fato que já mostrou afetar negativamente a porcentagem de emergência de parasitóides dessa família (ALBUQUERQUE et al., 2000).

A razão sexual dos descendentes não diferiu significativamente entre a testemunha e lufenuron, ficando em aproximadamente 0,82 (Tabela 2). Espécies de *Telenomus* caracterizam-se por apresentarem progênes com alta proporção de

fêmeas, principalmente se o parasitismo ocorre nos primeiros 5 dias de vida (PACHECO & CORRÊA-FERREIRA, 1998; NAKAMA & FOERSTER, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Pratissoli et al. (2004) e Carvalho et al. (1994), que em testes sobre o efeito de diversos reguladores de crescimento em *Trichogramma pretiosum*, também não encontraram alteração na razão sexual.

A porcentagem de emergência dos descendentes das fêmeas em contato com lufenuron foi estatisticamente igual ao controle (aproximadamente 82%), mostrando que o efeito negativo desse pesticida não se estendeu aos embriões do parasitóide (Tabela 2). Resultado semelhante foi encontrado em bioensaios de laboratório com *T. pretiosum* (ROCHA & CARVALHO, 2004).

Lufenuron afetou significativamente a capacidade de parasitismo de *T. podisi*, a tendo reduzido em 9,61% (Tabela 3). Mesmo apresentando esse efeito negativo ele foi enquadrado como inócuo ou levemente nocivo (N) para esse parasitóide, uma vez que a redução na capacidade benéfica foi inferior a 50%. Resultado semelhante (inócuo) foi obtido para *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae) em testes de laboratório com o também inibidor da síntese de quitina diflubenzuron (GODOY et al., 2005b). Em bioensaios de laboratório sobre o efeito de pesticidas a *T. pretiosum* (ROCHA & CARVALHO, 2004) e *T. cacoeciae* (HASSAN et al., 1998) lufenuron também reduziu significativamente a capacidade de parasitismo (65,1% e 34,8%, respectivamente), sendo enquadrado como Levemente Nocivo / Classe 2 para ambos parasitóides.

A diminuição na capacidade de parasitismo de *T. podisi* pode ter ocorrido devido ao efeito transovariano de lufenuron, já constatado afetando a fecundidade de diversas espécies de insetos, como *T. pretiosum* (ROCHA & CARVALHO, 2004), *T. cacoeciae* (GRÜTZMACHER et al., 2004) *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) (ÁVILA & NAKANO, 1999), *Podisus nigrispinos* (Hemiptera: Pentatomidae) (EVANGELISTA Jr. et al., 2002).

**Tabela 2:** Número de ovos de *Euschistus heros* parasitados por fêmea de *Telenomus podisi* (capacidade de parasitismo), porcentagem de emergência e razão sexual dos indivíduos ( $X \pm EP$ ) oriundos de fêmeas que entraram em contato com folhas tratadas com Match EC e Mentox EC. Temperatura  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 20\%$ ; Fotofase: 14 horas.

Ingrediente ativo/ Produto Comercial	Capacidade Parasitismo	Emergência (%)	Razão Sexual <sup>1</sup>
Testemunha	$40,49 \pm 2,48a$	$83,23 \pm 1,86a$	$0,83 \pm 0,01a$
Lufenuron/Match EC	$36,90 \pm 1,74b$	$81,86 \pm 1,78a$	$0,82 \pm 0,01a$
Paration Metílico/ Mentox 600 EC*	-	-	-
F tratamentos	$16,49^{**}$	2,82 ns	3,56 ns
CV	5,56	2,21	1,29

Médias ( $X \pm EP$ ) com a mesma letra não diferem entre si

<sup>1</sup>Razão Sexual = fêmeas/ (machos + fêmeas)

\* Como houve 100% de mortalidade nesse tratamento ele não foi incluindo na análise de variância

\*\* 5%

A inocuidade e pouca redução de lufenuron na capacidade de parasitismo de *T. podisi* (9,61%) quando comparada a redução causada na capacidade benéfica de outros parasitoides de ovos pode ter ocorrido tanto pela pouca sensibilidade dessa espécie aos resíduos do pesticida, quanto pela forma de exposição dos parasitoides aos resíduos. Uma vez que os pesticidas tendem a ter seus efeitos reduzidos (em comparação a bioensaios em condições de laboratório) quando aplicados em condições de laboratório estendido, semi-campo, pois, nessas circunstâncias, dispõem de abrigos de escape e/ou podem evitar locais contaminados com os produtos e, além disso, a degradação dos compostos pela ação da luz, geralmente é acelerada

**Tabela 3:** Efeito de Match EC e Mentox EC sobre o número médio ( $X \pm EP$ ) de ovos de *Euschistus heros* parasitados por fêmeas de *Telenomus podisi*, porcentagem de redução na capacidade de parasitismo (R) e classe de toxicidade dos produtos avaliados. Temperatura  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 20\%$ ; Fotofase: 14 horas.

Ingrediente ativo/ Produto Comercial	Ovos/fêmea	R (%)	Classe*
Testemunha	$40,49 \pm 2,48a$	-----	-----
Lufenuron/Match EC	$36,90 \pm 1,74b$	9,61	N
Paration Metílico/Mentox 600 EC**	-	100	T

Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si ( $P < 0,05$ );

\*Três categorias de avaliação: N = inócuo ou levemente tóxico (redução 0-50%), M = moderadamente tóxico (redução de 51-75%), T = tóxico (redução  $> 75\%$ ) (Boller *et al.*, 2005)

\*\* Como houve 100% de mortalidade nesse tratamento ele não foi incluindo na análise de variância

Os resultados obtidos neste bioensaio serviram para corroborar a adequabilidade da metodologia desenvolvida no presente trabalho, uma vez que os dados gerados foram compatíveis com dados existentes na literatura. Esse fato é de extrema importância, pois dá credibilidade a metodologia, mostrando que além de sua praticidade ela foi capaz de fornecer resultados confiáveis.

Outro ponto a ser discutido é a utilização do sistema desenvolvido (Sistema Aspecle) para testes de laboratório estendido com outras espécies, pois tanto o tamanho das gaiolas, a forma de exposição das folhas tratadas e o modo de introdução dos parasitóides são compatíveis com as características e biologia de diversas espécies de organismos benéficos. Esse sistema também pode ser adaptado para testes de duração do efeito danoso de pesticidas (persistência), ampliando ainda mais suas funções.

## 5 CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida mostrou-se viável para avaliação da seletividade de inseticidas ao parasitoide *T. podisi* em condições de laboratório estendido, uma vez que: i) cumpriu todos os critérios estabelecidos pela IOBC; ii) apresentou estabilidade nos resultados, com embasamento literário para os mesmos; iii) é prática e fácil de ser reproduzida.

## 6 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

AESCHLIMANN, J.P. Technology transfer in biological control: from research to practice, Montpellier, September 1996. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.64, p.277-278, 1997.

ALBUQUERQUE, F.A.; Lima, S.S.L.; Zabini, A.V.; Pattaro, F.S.; Borges, L.M. Viabilidade de ovos de *Nezara viridula* (L.) armazenados a baixas temperaturas para o parasitismo por *Trissolcus basal* (Woll.). **Acta Scientiarum**, v.22, p.963-967, 2000.

ÁVILA, C.J.; NAKANO, O. Efeito do Regulador de Crescimento Lufenuron na Reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p.293-299, 1999.

BARRET, K.L.; GRANDY, N.; HARRISON, E.G.; HASSAN, S.A.; OOMEN, P.A. **Guidande document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods**. In: ESCORT Workshop European Standard Characteristics of Regulatory Testing. Netherlands :IAC Wageningen, 51p. 1994.

BOLLER, E.F.; HEIDRUN, V.; TERNES, P.; MALAVOLTA C. Working Document on Selectivity Pesticides. **IOBC/WPRS**, p.1-9 2005.

CAÑETE, C.L. **Seletividade de inseticidas a espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. Tese Doutorado, Zoologia, UFPR, Curitiba, 117p. 2005.

CARVALHO, G. A.; TIRONI, P.; RIGITANO, R. L.O.; SALGADO, L. O. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento de insetos à *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.431-434, 1994.

CONSOLI, F.L.; BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Selectivity of insecticides to the egg parasitoid *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988, (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Applied Entomology**, v.125, p.37-43, 2001.

CZEPAK C.; FERNANDES, P.M.; ALBERNAZ, K.C.; RODRIGUES O.D.; SILVA, L.M.; SILVA, E.A.; TAKATSUKA, F.S.; BORGES J.D. Seletividade de inseticidas ao complexo de inimigos naturais na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35, p.123-127, 2005.

DEGRANDE, E. **Otimização e prática da metodologia da IOBC para avaliar o efeito de pesticidas sobre *Trichogramma cacoeciae* (Trichogrammatidae) e *Chrysoperla carnea* (Chrysopidae)**. Tese Doutorado, Esalq/USP, Piracicaba, p.109, 1996.

DEGRANDE, E.; GOMEZ, D.R.S. Seletividade de produtos químicos no controle de pragas. **Agrotécnica, Ciba-Geigy**, v.7, p.8-13, 1990.

DEGRANDE, P.E.; REIS, P.R.; CARVALHO, G.A.; BELARMINDO, L.C. Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2001. Cap. 5, p.71-94.

EVANGELISTA JR., W.S.; SILVA-TORRES, C.S.A.; TORRES, J.B. Toxicidade de Lufenurum para *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p. 319-326, 2002.

FOERSTER, L.A.; NAKAMA, P.E. Efeito da Estocagem em Baixa Temperatura na Capacidade Reprodutiva e Longevidade de *Trissolcus basalus* (Wollaston) e *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p.115-120, 2002.

GIOLO F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; MANZONI, C.G.; FACHINELLO, J.C.; NÖRNBERG, S.D.; STEFANELLO JUNIOR G.J. Seletividade de agrotóxicos indicados na produção integrada de pêssego a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.222-225, 2005.

GIOLO F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; MANZONI, C.G.; LIMA, C.A.B.; NÖRNBERG, S.D. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura do pessegueiro sobre adultos de *Trichogramma pretiosum*. **Bragantia**, v.66, p.423-43, 2007.

GODOY, K.B.; ÁVILA, C.J. Parasitismo natural em ovos de dois percevejos da soja, na região de Dourados, MS. **Revista de Agricultura**, v 75, p 271-279, 2000.

GODOY, K.B.; GALLI, J.C.; AVILA, C.J. Parasitismo em ovos de percevejos da soja *Euschistus heros* (Fabricius) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) em São Gabriel do Oeste. **Ciência Rural**, v.35, p.455-458, 2005a.

GODOY, K.B.; GALLI, J.C.; AVILA, C.J.; CORREA-FERREIRA, B.S. Seletividade de inseticidas a *Trissolcus basalís* (woll.) (HYM.: Scelionidae) em laboratório. **Revista de Agricultura**, v.80, p.300-315, 2005b.

GRÜTZMACHER, A.D.; ZIMMERMANN, O.; YOUSEF, A.; HASSAN, S.A. The side-effects of pesticides used in integrated production of peaches in Brazil on the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Journal of Applied Entomology**, v.128, p.377–383, 2004.

HASEEB, M.; AMANO, H.; NEMOTO, H. Pesticidal effects on mortality and parasitism rates of *Diadegma semiclausum*, a parasitoid of the diamondback moth. **BioControl**, v.45, p.165–178, 2000.

HASSAN S.A. Testing methodology and the concept of the IOBC/WPRS Working Group. In: JEPSON, P.C. (Ed.) **Pesticides and non-target invertebrates**. Winborne, Dorset: Intercept, 1989, p.1-18 p.

HASSAN, S.A. Guideline for the evaluation of side-effects of plant protection product on *Trichogramma cacoeciae*. In: HASSAN, S.A. Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: description of test methods. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.15, p.18- 39, 1992.

HASSAN, S.A. Métodos padronizados para testes de seletividade com ênfase em *Trichogramma*. In: PARRA J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**, v.8, p.207-233, 1997.

HASSAN, S.A. The side-effects of pesticides on the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae), acute dose-response and persistence tests. **Journal of Applied Entomology**, v.12, p.569-573, 1998.

HASSAN S.A.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J. ; CALIS, J.N.M.; CHIVERTON, P.; COREMANS-PELSENEER, J. ; DUSO, C.; GROVE, A. ; HEINBACH, U.J.; HELYER, N. ; HOKKANEN, H. ; LEWIS, G.B.; MANSOUR, F.; MORETH, L.; POLGAR, L.; SANSOE-PETERSEN, L.; SAUPHANOR, B.; STÄUBLI, A.; TAVARES, K.; TUSET, J.J.; VIGGIANI, G. Results of the fifth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS Workin Group “Pesticides and Beneficial Organisms”. **Entomophaga**, v.39, p.107-119, 1994.

HASSAN S.A.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J. ; CALIS, J.N.M.; CHIVERTON, P.; DICKLER, E.; EASTERBROOK, M.A.; EDWARDS, P.J.; ENGLERT, W.D.; FIRTH, S.I.; HUANG, P.; INGLESFIELD, C.; KINGLAUF, F.; KUHNER, C.; LEDIEU, M.S.; NATON, E.; OOMEN, P.A.; OVERMEER, W.P.J.; PLEVOETS, P.; REBOULET, J.N.; RIECKMANN, W.; SANSOE-PETERSEN, L.;

SHIRES, S.W.; STÄUBLI, A.; STEVENSON, J.; TUSET, J.J.; VANWETS INKEL, G.; VAN ZON, A.Q. Standard methods to test the side effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WRPS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **EPPO Bulletin**, v.15, p.214-255, 1985.

HASSAN, S.A.; DEGRANDE, P.E. Methods to test the side-effects of pesticides on *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R. (Ed.). **Curso de controle biológico com *Trichogramma***. Piracicaba: FEALQ, 1996. p.63-74.

HASSAN, S. A.; HALSALL, N.; GRAY, A. P.; KUEHNER, C.; MOLL, M.; BAKKER, F.M.; ROEMBKE, J.; YOUSEF, A.; NASR, F.; ABDELGADER, H. A laboratory method to evaluate the side-effects of plant protection products on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). In: CANDOLFI, M. P.; BLUMMEL, S.; FORSTER, R.; BAKKER, F. M.; GRIMM, C.; HASSAN, S. A.; HEIMBACH, U.; MEAD-BRIGGS, M. A.; REBER, B.; SCHMUCK, R.; VOGT, H. (Ed.). **Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods**. IOBC/WRPS, p.107–119p, 2000.

MANZONI, C.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; HÄRTER, W.R.; CASTILHOS, R.V.; PASCHOAL, M.D.F. Seletividade de agroquímicos utilizados na produção integrada de maçã aos parasitóides *Trichogramma pretiosum* Riley e *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Bioassay**, v.2, p.1-11, 2007.

MANZONI C.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; LIMA, C.A.B.; NÖRNBERG, S.D.; HÄRTER, W.R.; MULLER, C. Seletividade de agrotóxicos recomendados na produção integrada da maçã a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 254-257, 2006.

MORANDI FILHO, W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; MANZONI, C.G. Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Rural**, v.36, p.1072-1078, 2006.

MORANDI FILHO, W.J.; MÜLLER, C.; LIMA, C.A.B.; HÄRTER, W.R.; GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D. Avaliação de metodologias para testes de seletividade de inseticidas reguladores de crescimento a *Trichogramma pretiosum* (Riley,1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) na cultura da macieira em condições de laboratório. **Idesia**, v.26, p.79-85, 2008.

NAKAMA, P.A.; FOERSTER, L.A. Efeito da alternância de temperaturas no desenvolvimento e emergência de *Trissolcus basalís* (Wollaston) e *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). **Neotropical Entomology**, v.30, p.269–275, 2001.

PACHECO, D.J.P.; CORREA-FERREIRA, B.S. Potencial reprodutivo e longevidade do parasitóide *Telenomus podisi* Ashmead, em ovos de diferentes espécies de percevejos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, p.585-591, 1998.

PACHECO, D.J.P.; CORREA-FERREIRA, B.S. Parasitismo de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) em Populações de Percevejos Pragas da Soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p.295-302, 2000.

PANIZZI, A.R. Ecologia nutricional de insetos sugadores de sementes. In: PANIZZI, A.R. & PARRA, J.R.P. Parra. **Ecologia nutricional dos insetos e suas implicações no manejo integrado de pragas**. São Paulo: Manole, 1991, p.253-287.

PEDIGO, L.P. **Entomology and pest management**. New York: Macmillan, 1988. p.646.

PERES, W.A.A.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Methodology of Mass Multiplication of *Telenomus podisi* (Ash.) and *Trissolcus basalís* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae) on Eggs of *Euschistus heros* (Fab.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v.33, p.457-462, 2004.

PINHO-MOURA A.; CARVALHO, G.A.; RIGITANO, R.L.O. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.203-210, 2005.

PRATISSOLI D.; THULER, R.T.; PEREIRA, F.F.; REIS, E.F.; FERREIRA, A.T. Ação transovariana de lufenuron (50 g/l) sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu efeito sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Agrotecnica**, v.28, p.9-14, 2004.

RIPPER, W.E.; GREENSLADE, R.M.; HARTLEY, G.S. Selective insecticides and biological control. **Journal of Economic Entomology**, v.44, p.448-458, 1951.

ROCHA, L.C.D.; CARVAHO, G.A. Adaptação da metodologia padrão da IOBC para estudos de seletividade com *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de Laboratório. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.26, p.315-320, 2004.

SILVA, C.C.; LAUMANN, R.A.; BLASSIOLI, M.C.; PAREJA; M.; BORGES, M. *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.575-580, 2008.

STERK, G.; HASSAN, S.A.; BAILLOD, M.; BAKKER, F.; BIGLER, F.; BLÜMEL, S.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BROMAND, B.; BRUN, J.; CALIS, J.N.M.; COREMANS-PELSENEER, J.; DUSO, C.; GARRIDO, A.; GROVE, A.; HEIMBACH, U.; HOKKANEN, H.; JACAS, J.; LEWIS, G.; MORETH, L.; POLGAR, L.; ROVERSTI, L.; SAMSOE-PETERSEN, L.; SAUPHANOR, B.; SCHAUB, L.; STÄUBLI, A.; TUSET, J.J.; VAINIO, A.; VAN DE VEIRE, M.; VIGGIANI, G.; VIÑUELA, E.; VOGT, H. Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'. **BioControl**, v.44, p.99-117, 1999.

ZHANG, W.; HASSAN, S.A. Rationalising the standard method to test the side-effects of pesticides on *Trichogramma cacoeciae*, reducing the number of parasitoids tested. **IOBC/WPRS Bulletin**, Montfavet, v.23, p.49-53, 2000.

## APÊNDICE



**Apêndice 1** – Componentes do sistema de ventilação (bomba de vácuo, tubo central e mangueiras) utilizado para impedir a formação de gases tóxicos no interior das gaiolas de exposição.



**Apêndice 2-** Sistema de ventilação: conexão do tubo central com a bomba de vácuo.



**Apêndice 3** – Sistema de ventilação: detalhe da conexão das gaiolas com tubo central.



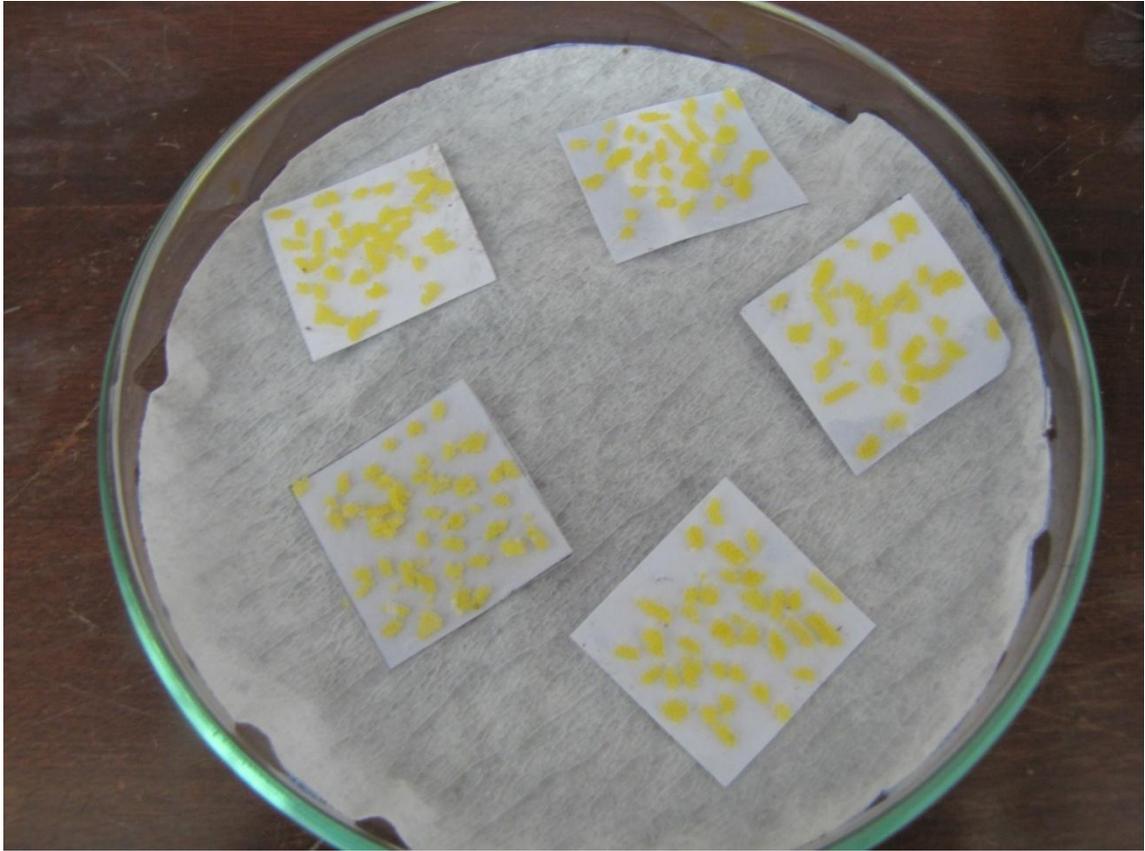
**Apêndice 4** - Tubos de emergência utilizados no teste para avaliar o melhor método de se introduzir os parasitóides na gaiola.



**Apêndice 5** - Detalhe dos tubos de emergência conectados às gaiolas (com e sem a capa de papel cartão).



**Apêndice 6** – Gaiolas de contato contendo folhas tratadas com pesticidas e conectadas ao sistema de ventilação.



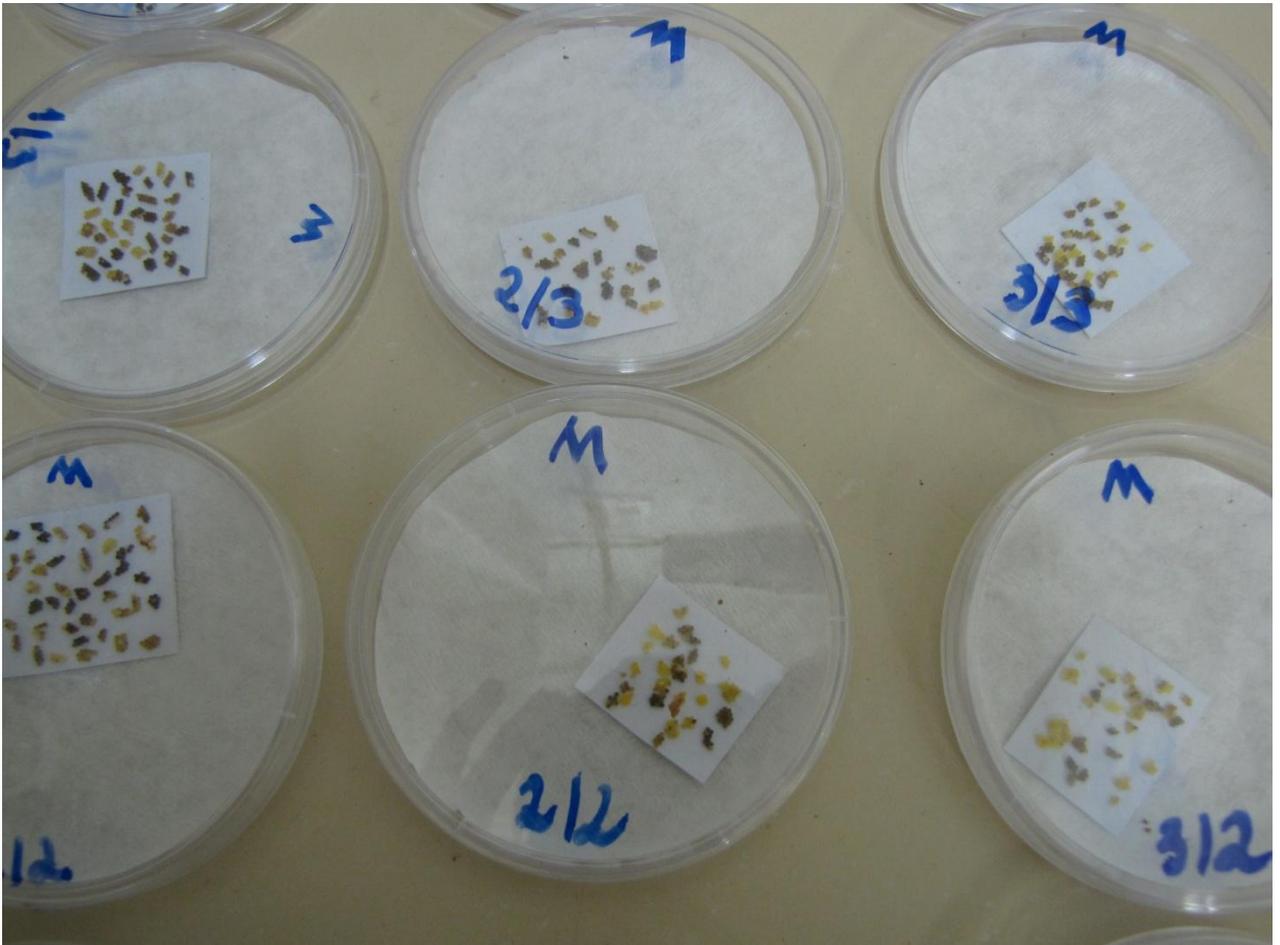
**Apêndice 7** - Cartões contendo ovos de *Euschistus heros* a serem ofertados para as fêmeas de *Telenomus podisi*.



**Apêndice 8** - Cartão com ovos de *Euschistus heros* sendo parasitados por fêmeas de *Telenomus podisi* dentro da gaiola.



**Apêndice 9** - Placas de Petri contendo as cartelas com ovos parasitados por *Telenomus podisi* durante o experimento.



**Apêndice 10** - Detalhe das cartelas contendo os ovos parasitados durante o experimento.

