**OTIMIZAÇÃO E PRÁTICA DA METODOLOGIA DA IOBC PARA AVALIAR
O EFEITO DE PESTICIDAS SOBRE *Trichogramma cacoeciae*
(TRICHOGRAMMATIDAE) E *Chrysoperla carnea* (CHRYSOPIDAE)**

PAULO EDUARDO DEGRANDE
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Octávio Nakano (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil)

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área
de Concentração: ENTOMOLOGIA

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Degrande, Paulo Eduardo

Otimização e prática da metodologia da IOBC para avaliar o efeito de pesticidas sobre *Trichogramma cacoeciae* (Trichogrammatidae) e *Chrysoperla carnea* (Chrysopidae) / Paulo Eduardo Degrande. - - Piracicaba, 1996.

109p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Crisopídeo - Efeito de pesticida - Avaliação 3. Inseto para controle biológico 4. Pesticida 5. Tricogramatídeo - Efeito de pesticida - Avaliação
I. Título

CDD 595.79
595.747
632.95

**OTIMIZAÇÃO E PRÁTICA DA METODOLOGIA DA IOBC PARA AVALIAR
O EFEITO DE PESTICIDAS SOBRE *Trichogramma cacoeciae*
(TRICHOGRAMMATIDAE) E *Chrysoperla carnea* (CHRYSOPIDAE)**

Paulo Eduardo Degrande

Aprovada em: 16/12/1996

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Octávio Nakano (Orientador)	ESALQ/USP
Prof. Dr. Celso Omoto	ESALQ/USP
Prof. Dr. Gilberto José de Moraes	ESALQ/USP
Prof. Dr. Sérgio de Freitas	UNESP/Jaboticabal
Prof. Dr. Santin Gravena	UNESP/Jaboticabal

Prof. Dr. Octávio Nakano
Orientador

**À minha esposa, Denise Pereira Degrande,
DEDICO**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Octávio Nakano, Professor Titular do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP em Piracicaba, pela orientação, estímulo profissional e amizade;

Ao Dr. Sherif A. Hassan, Cientista do *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)*, *Institut für biologischen Pflanzenschutz (BI)* em Darmstadt, na Alemanha, pela co-orientação e apoio;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade de realizar o Curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos do Programa de Incentivo à Capacitação Docente (PICDT);

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, na sistemática de Doutorado-Sanduiche no Exterior, processo 201417/94(4);

À Dra. Heidrum Vogt, Cientista do *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)*, *Institut für Pflanzenschutz im Obstbau* em Dossenheim, na Alemanha, pelas orientações durante a condução dos testes com *Chrysoperla*;

Ao Dr. Celso Omoto, Professor do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pela amizade, convívio agradável e inestimável colaboração;

Aos Drs. José Djair Vendramim e José Roberto Postali Parra, Professores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP em Piracicaba, pela atenção durante a elaboração do Plano de Estudos;

Ao Dr. Hideo Dodo, Diretor de Pesquisa da AgrEvo em São Paulo, e sua Equipe, pelo estímulo e apoio;

Aos Colegas do Curso de Pós-graduação em Entomologia da ESALQ, pelo companheirismo;

À todos professores do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, em Piracicaba, pelos ensinamentos;

À assistente de laboratório *Frau* Hildegard Liscinsky, *Herr* Bernd Gehard Wührer e *Herr* Nafi Cümbüscü, todos do BBA em Darmstadt (Alemanha), pela colaboração;

À todas as pessoas que direta, ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE APÊNDICES	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Seletividade	4
2.2 Concepção do Grupo de Trabalho ‘Pesticidas e Organismos Benéficos’	12
2.3 <i>Trichogramma</i>	16
2.4 <i>Chrysoperla carnea</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Experimentos com <i>Trichogramma cacoeciae</i>	20
3.1.1 Toxicidade em adultos	21
3.1.1.1 Pesticidas-teste	21
3.1.1.2 Pesticida da testemunha positiva	21
3.1.1.3 Medidas de segurança no manuseio dos pesticidas	21
3.1.1.4 Procedência dos insetos teste	22

3.1.1.5 Gaiolas de contato dos insetos com o pesticida.....	22
3.1.1.6 Criação e manutenção dos indivíduos	25
3.1.1.6.1 Material biológico para o teste.....	25
3.1.1.6.2 Criação dos insetos.....	25
3.1.1.6.2.1 <i>T. cacoeciae</i>	25
3.1.1.6.2.2 <i>S. cerealella</i>	26
3.1.1.6.3 Confeção dos cartões com ovos do hospedeiro	26
3.1.1.6.4 Composição e conservação do alimento dos adultos de <i>T. cacoeciae</i>	27
3.1.1.7 Aplicação dos tratamentos.....	27
3.1.1.8 Tratamentos, parcela e repetições.....	28
3.1.1.9 Infestação.....	28
3.1.1.10 Cálculo da população inicial de <i>T. cacoeciae</i>	29
3.1.1.11 Oferta de ovos hospedeiros para parasitismo.....	29
3.1.1.12 Desmontagem das gaiolas.....	30
3.1.1.13 Cálculo da eficiência de parasitismo	30
3.1.1.14 Controle de qualidade de <i>T. cacoeciae</i>	31
3.1.1.15 Preparo dos tubos de emergência.....	32
3.1.1.16 Condições climáticas experimentais	34
3.1.1.17 Distribuição cronológica das atividades.....	34
3.1.2 Toxicidade em pupas.....	35
3.1.3 Persistência em adultos (laboratório-ampliado)	36
3.1.4 Toxicidade em larvas.....	38
3.1.5 Toxicidade em ovos	38
3.2 Experimentos com <i>Chrysoperla carnea</i>	38
3.2.1 Criação de <i>C. carnea</i>	39
3.2.2 Delineamento e unidade de teste.....	40
3.2.3 Preparo e contato dos insetos-teste.....	42
3.2.4 Aplicação dos tratamentos.....	42
3.2.5 Infestação e contato dos insetos no pesticida em teste.....	43
3.2.6 Avaliação	43

3.3 Classes da IOBC e análise estatística	45
3.4 Ingredientes ativos dos pesticidas	46
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Experimentos com <i>T. cacoeciae</i>	47
4.1.1 Toxicidade em adultos, pupas, larvas e ovos.....	47
4.1.2 Persistência em adultos (laboratório-ampliado)	56
4.1.3 Parâmetros experimentais padronizados.....	64
4.2 Experimentos com <i>C. carnea</i>	71
4.3 Sumário dos resultados	77
4.3.1 Experimentos com <i>Trichogramma cacoeciae</i>	77
4.3.1.1 Toxicidade a adultos.....	77
4.3.1.2 Toxicidade a pupas.....	78
4.3.1.3 Persistência	78
4.3.1.4 Parâmetros experimentais padronizados.....	78
4.3.2 Experimentos com larvas de <i>C. carnea</i>	78
4.4 Considerações finais	79
 5. CONCLUSÕES.....	81
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
 APÊNDICE	96

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1 - Exemplo de aplicação do “programa da IOBC de controle de qualidade” para <i>Trichogramma</i> , na população inicial, para testes de seletividade	97
Apêndice 2 - Videiras tratadas (um tratamento), cv. Müller-Thurgau, cultivadas em vasos sob condições de casa de vegetação nos experimentos de laboratório-ampliado (persistência).	98
Apêndice 3 - Tubo de emergência escurecido (encapado) e conectado na gaiola de contato (com folhas de videira no interior - experimento de persistência de pesticidas a <i>T. cacoeciae</i>).	99
Apêndice 4 - Sistema com as gaiolas de contato, conexões e mangueiras (ver os cartões de papel com círculos de ovos no interior das gaiolas).....	100
Apêndice 5 - Cartões de papel com ovos de <i>S. cerealella</i> para mensurar os resultados (direita: cartão de papel com ovos de <i>S. cerealella</i> (1 dia) não parasitados; esquerda: cartão com ovos parasitados por <i>T. cacoeciae</i>).	101
Apêndice 6 - Cartões de papel com círculos de ovos de <i>S. cerealella</i> parasitados (esquerda) e não parasitados por <i>T. cacoeciae</i> (direita), para a confecção dos tubos de emergência (população inicial).	102

Apêndice 7 - Cartões de papel com círculos de ovos para avaliação de resultados (ovos de <i>S.cerealella</i> parasitados).....	103
Apêndice 8 - Cartões de papel com círculos de ovos obtidos de uma repetição (gaiola de contato) no final do experimento. Cerca de 18.000 ovos de <i>S. cerealella</i> oferecidos para parasitismo/parcela: no segundo dia (dia seguinte ao tratamento) três cartões de papel, no terceiro dia foram oferecidos dois cartões de papel e no quinto apenas um cartão	104
Apêndice 9 - Unidade de teste para experimentação com <i>C. carnea</i>	105
Apêndice 10 - Detalhe da arena de contato das larvas de <i>C. carnea</i> com o pesticida.....	106
Apêndice 11 - Infestação de larvas de <i>C. carnea</i> na unidade de teste	107
Apêndice 12 - Detalhe da alimentação das larvas de <i>C. carnea</i> na unidade de teste.....	108
Apêndice 13 - Gaiola de reprodução de <i>C. carnea</i>	109

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Representação da gaiola de contato para os testes com <i>Trichogramma</i> (dimensões em milímetros).....	24
Figura 2 - Representação do tubo de emergência para a infestação da população inicial (dimensões em milímetros).....	33
Figura 3 - Cronologia dos procedimentos nos testes com <i>Trichogramma</i>	35
Figura 4 - Representação da unidade de teste para os experimentos com <i>C. carnea</i> (dimensões em milímetros)	41
Figura 5 - Experimento de persistência: representação gráfica da porcentagem de redução na capacidade de parasitismo de <i>T. cacoeciae</i> , em relação à testemunha, nos diversos tratamentos. Exposição de adultos em folhas de videira pulverizadas, a intervalos variáveis de tempo (dias após a pulverização).....	57
Figura 6 - Representação gráfica do número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (<i>T. cacoeciae</i>) conduzidos e considerados válidos (média = 341,73; desvio padrão = 46,97)	66
Figura 7 - Representação gráfica da frequência (observada) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (<i>T. cacoeciae</i>) conduzidos e considerados válidos	67

- Figura 8 - Representação gráfica da frequência (relativa) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacaoeciae*) conduzidos e considerados válidos 68
- Figura 9 - Representação gráfica do número de ovos por fêmea, em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacaoeciae*) conduzidos e considerados válidos (média = 31,77; desvio padrão = 5,35)..... 70
- Figura 10 - Número de ovos/fêmea em relação ao número de fêmeas/gaiola nas parcelas dos tratamentos testemunha negativa. Limiar = 15 71

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - <u>Experimento 1</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC	48
Tabela 2 - <u>Experimento 2</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC	49
Tabela 3 - <u>Experimento 3</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC	49
Tabela 4 - <u>Experimento 4</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.	50
Tabela 5 - <u>Experimento 5</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.	50
Tabela 6 - <u>Experimento 6</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.	51
Tabela 7 - <u>Experimento 7</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos /	

fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.	51
Tabela 8 - <u>Experimento 8</u> (adultos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.	52
Tabela 9 - Resultados de seis experimentos (adultos de <i>T. cacoeciae</i>). Porcentagem de redução na capacidade de parasitismo das fêmeas (%R) e classe da IOBC; ovos por fêmea e média da população inicial nas testemunhas negativas.....	52
Tabela 10 - <u>Experimento 11</u> (pupas de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.	53
Tabela 11 - <u>Experimento 9</u> (ovos de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução).....	53
Tabela 12 - <u>Experimento 10</u> (larvas de <i>T. cacoeciae</i>): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de <i>T. cacoeciae</i> (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução).....	54
Tabela 13 - <u>Experimento de persistência</u> : redução na capacidade de parasitismo de <i>T. cacoeciae</i> (%), em relação a testemunha, nos diversos tratamentos. DAA = dias após a pulverização.....	56
Tabela 14 - Toxicidade de diferentes pesticidas a <i>T. cacoeciae</i> . Resultados obtidos no <u>teste a</u> (adultos), no <u>teste b</u> (pupas) e <u>teste de persistência</u> (contato de adultos em folhas de videira tratadas, a intervalos variáveis de tempo). Porcentagem de redução (%R) na capacidade de parasitismo. Persistência do pesticida, em dias após a aplicação (DAA). Classe da IOBC nos diferentes tipos de teste (Classe)	62

Tabela 15 - Número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (<i>T. cacoeciae</i>) conduzidos e considerados válidos.....	66
Tabela 16 - Frequência (observada) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (<i>T. cacoeciae</i>) conduzidos e considerados válidos.....	67
Tabela 17 - Frequência (relativa) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (<i>T. cacoeciae</i>) conduzidos e considerados válidos.....	67
Tabela 18 - Número de ovos por fêmea, em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (<i>T. cacoeciae</i>) conduzidos e considerados válidos	70
Tabela 19 - Mortalidade de <i>C. carnea</i> no <u>Teste A</u> . Primeiro instar (L1), larvas mortas (dados acumulados totais), período larval, pupas mortas, período pupal, sobreviventes (larvas + pupas) e mortalidades (%).....	74
Tabela 20 - Resultados da reprodução de <i>C. carnea</i> na testemunha negativa (<u>Teste A</u>). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.....	74
Tabela 21 - Resultados da reprodução de <i>C. carnea</i> no tratamento Sumicidin Alpha a 60 ml/ha (<u>Teste A</u>). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.....	75
Tabela 22 - Mortalidade de <i>C. carnea</i> no <u>Teste B</u> . Primeiro instar (L1), larvas mortas (dados acumulados totais), período larval, pupas mortas, período pupal, sobreviventes (larvas + pupas) e mortalidades	75
Tabela 23 - Resultados da reprodução de <i>C. carnea</i> na testemunha negativa (<u>Teste B</u>). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.....	76
Tabela 24 - Resultados da reprodução de <i>C. carnea</i> no tratamento Sumicidin Alpha a 60 ml/ha (<u>Teste B</u>). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.....	76

**OTIMIZAÇÃO E PRÁTICA DA METODOLOGIA DA IOBC PARA AVALIAR
O EFEITO DE PESTICIDAS SOBRE *Trichogramma cacoeciae*
(TRICHOGRAMMATIDAE) E *Chrysoperla carnea* (CHRYSOPIDAE)**

**Autor: Paulo Eduardo Degrande
Orientador: Prof. Dr. Octávio Nakano**

RESUMO

O trabalho teve por objetivo utilizar e aprimorar os métodos experimentais de laboratório para a avaliação do efeito de pesticidas sobre um parasitóide (*T. cacoeciae*) e um predador (*C. carnea*), obedecendo-se o programa de pesquisa proposto pela “International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)”. Os testes com *T. cacoeciae* foram subdivididos em: a) experimentos com o estágio de vida mais vulnerável; b) experimentos com o estágio de vida menos vulnerável; c) experimentos de avaliação da duração da nocividade de pesticidas (persistência). Com *C. carnea* foram feitas exposições de larvas (estágio mais vulnerável) a um filme fresco e seco do pesticida. A mensuração do efeito total do(s) pesticida(s) foi obtida pela combinação dos efeitos do pesticida na mortalidade, reprodução e capacidade benéfica dos insetos. Quatro ‘Classes’ foram utilizadas para classificar os resultados. Conclui-se que: 1) os métodos de pesquisa da IOBC/WPRS visando os testes de seletividade de pesticidas mostram estabilidade de resultados, o que permite a adoção dos mesmos; 2) a reprodutibilidade dos experimentos tem uma dependência estreita da utilização de parâmetros experimentais padronizados; 3) *T. cacoeciae* e *C. carnea* são materiais biológicos adequados aos testes de seletividade preconizados pela IOBC/WPRS; 4) as melhorias feitas nos testes de seletividade, através deste trabalho, são sugeridas para maior praticidade, precisão e reprodutividade dos procedimentos.

**OPTIMIZATION AND PRACTICE OF THE IOBC METHODOLOGY TO
EVALUATE THE EFFECTS OF PESTICIDES ON *Trichogramma cacoeciae*
(TRICHOGRAMMATIDAE) AND *Chrysoperla carnea* (CHRYSOPIDAE)**

**Author: Paulo Eduardo Degrande
Adviser: Prof. Dr. Octávio Nakano**

SUMMARY

The objective of this work was to utilize and improve laboratory experimental methods to evaluate the effect of pesticides on a parasitoid (*T. cacoeciae*) and a predator (*C. carnea*) according with the research program proposed by the International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS). Tests with *T. cacoeciae* consisted of: a) experiments with the most vulnerable life stage; b) experiments with the less vulnerable life stage; c) experiments of the duration of harmful activity of pesticides (persistence). Expositions of *C. carnea* larvae (most vulnerable stage) to fresh and dry films of pesticides were made. The assessment of the total effect of the pesticide was obtained by the combination of the pesticide effects on mortality, reproduction and beneficial capacity of the insects. Four 'Categories' were used to express the results. The conclusions are: 1) the research methods of IOBC/WPRS aiming at the tests of pesticide selectivity show stability of results, which allow their utilization; 2) the reproducibility of the experiments has a strong dependence of the utilization of standard experimental parameters; 3) *T. cacoeciae* and the *C. carnea* are adequate biological materials for the standard selectivity tests of IOBC/WPRS; 4) improvements of the achieved IOBC/WPRS selectivity tests are suggested for more practical, precise and reproductive procedures.

1 INTRODUÇÃO

A manutenção de parasitóides, predadores e patógenos que exercem controle biológico de pragas das plantas cultivadas é indispensável como fator de equilíbrio dinâmico nos agroecossistemas. Esta preservação minimiza a necessidade da intervenção do homem no controle de pragas. Por essa razão, no desenvolvimento de programas de manejo integrado, a compatibilização do uso dos métodos biológicos e químicos, tem recebido crescente atenção dos pesquisadores em muitas partes do mundo. Pesticidas seletivos que possam ser usados no controle de pragas, sem afetar adversamente importantes inimigos naturais devem ser incentivados.

A seletividade de pesticidas envolve estudos básicos e aplicados de manejo integrado, compatibilizando o controle biológico e o químico, numa dimensão ecológica de equilíbrio de agroecossistemas, diversidade e estabilidade de comunidades. Como a seletividade é parte de uma abordagem conservacionista dos sistemas de produção, através da proteção e fomento de organismos benéficos, podem ser preconizadas recomendações de proteção de plantas e informações para usuários de programas de manejo integrado. Estes estudos são bases para a minimização de efeitos não desejáveis, decorrentes do uso de pesticidas no controle de pragas. Estão envolvidos neste campo da ciência, métodos experimentais toxicológicos padronizados, de curto, médio e longo prazo, indicados para avaliar seletividade de pesticidas. Técnicas de criação de artrópodos, em paralelo, suportam a implementação de linhas de ação. Conceitualmente, são discutidos os tipos de seletividade, as bases bioquímicas e fisiológicas envolvidas,

efeito da densidade sobre o crescimento populacional, ambiente biótico: predador/presa e parasitóide/hospedeiro, interações benéficas, competição e evolução da interação entre espécies. Estudos da relação predador/presa e parasitóide/hospedeiro, com modelos matemáticos, passam a ser estendidos à inclusão de aplicação de pesticidas, inclusive com o uso da informática. Pontos de vista legais, comerciais e de desenvolvimento internacional são considerados. Limitações, implicações e conseqüências do uso da seletividade no controle de pragas, suportadas e relacionadas em bases ecológicas e do sistema produtivo são estabelecidas.

A pesquisa dos efeitos colaterais de pesticidas em organismos benéficos tem se tornado obrigatório em diversos países, fazendo com que se estabeleçam linhas de ação internacionalmente aprovadas e em regime de urgência, oferecendo estas informações aos usuários de programas de manejo integrado. No Brasil, não existe até o momento uma padronização de procedimentos de pesquisa sobre técnicas experimentais para avaliar a seletividade.

A "International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)" possui, desde 1974, o "Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'" com as seguintes missões: a) desenvolver padrões metodológicos de laboratório, semi-campo e campo para testes de efeitos secundários de pesticidas em organismos benéficos, de acordo com princípios aprovados internacionalmente; b) organizar programações internacionais conjuntas para testar o efeito secundário de pesticidas nos organismos benéficos; c) estabelecer uma cadeia de laboratórios de testes 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. A experiência acumulada durante os programas conjuntos de experimentação, torna possível ao Grupo recomendar métodos para pesquisa dos efeitos colaterais de pesticidas em organismos benéficos.

Este trabalho teve por objetivo o treinamento, a utilização e o aprimoramento das metodologias experimentais para avaliação do efeito de pesticidas

sobre um parasitóide (*Trichogramma cacoeciae*) e um predador (*Chrysoperla carnea*), utilizando-se o programa de pesquisa proposto pela IOBC/WPRS. Foi desenvolvido pela sistemática de Doutorado-Sanduiche no Exterior, com a parte experimental conduzida durante o estágio no *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Institut für biologischen Pflanzenschutz*, Heinrichstrasse 243, D-64287 Darmstadt, Alemanha; sob co-orientação do Dr. Sherif A. Hassan, coordenador do “Working Group ‘Pesticides and Beneficial Organisms’” da IOBC/WPRS.

Dois pontos estavam sendo críticos na condução dos experimentos com *T. cacoeciae*: o consumo de tempo e a obtenção de reprodutibilidade de resultados. Quando foi iniciado este trabalho, desafios foram propostos para tornar a metodologia laboratorial mais simplificada e rápida de ser conduzida com resultados reprodutíveis.

As principais causas de muitos casos de insucesso experimental estavam relacionadas com: a falta de padronização e controle de qualidade do material biológico disponível; imprecisões na contagem do número de ovos parasitados, decorrentes da sua distribuição em superfície de papel branco, inadequada para contagem; falta de padronização do número de adultos da população inicial; variabilidade no número de ovos ofertados para o parasitismo, frequência e forma de distribuição na gaiola; luminosidade e ventilação inadequada; período mínimo de contato dos insetos aos tratamentos; e, iniciação/falta de prática do pesquisador com a metodologia.

Esses problemas repercutiam, geralmente, em alta variabilidade de resultados (falso positivo e falso negativo) e diferentes desempenhos reprodutivos da espécie. Por isso, era necessário estabelecer procedimentos experimentais mais padronizados e racionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Seletividade

Uma parcela significativa do desequilíbrio biológico que ocorre em sistemas agrícolas deve-se ao uso inadequado dos defensivos. Aplicados de maneira indiscriminada, estes produtos podem levar à ressurgência, surtos de pragas secundárias e evoluir à resistência (DeBach, 1974; Chiang, 1985 e Nakano, 1986).

No moderno controle de pragas, são desenvolvidos sistemas de Manejo Integrado fundamentados em medidas que visam manter estes organismos abaixo do nível de dano econômico com maximização do rendimento das culturas (Nakano et al., 1981). De um modo geral, são sistemas representados pelos métodos biológicos, de resistência de plantas, métodos culturais e físicos, incluindo os métodos químicos, ainda indispensáveis para muitas pragas em diversas culturas, desde que utilizados de forma adequada e racional (Parra, 1993).

Na Agricultura Sustentável, o manejo integrado ocupa uma posição de destaque, por se tratar de uma metodologia consolidada e ter atuação a nível de espécie, agroecossistema e comunidade (Kogan, 1993).

Sistemas de controle que considerem aspectos econômicos, ecológicos, agronômicos, sociais e toxicológicos assumem grande importância em países em desenvolvimento. O estabelecimento de uma agropecuária baseada nestes princípios

permitirá produtividades satisfatórias, com qualidade de vida e a possibilidade de participação em mercados competitivos.

A presença de parasitóides, predadores e patógenos que exercem controle biológico dos insetos de importância agrícola é indispensável como fator de equilíbrio dinâmico em agroecossistemas. Essa presença minimiza a necessidade de intervenção do homem no controle de pragas, mediante outros métodos de redução populacional de insetos (Degrande & Gomez, 1990). Para Gravena (1992), o controle biológico é a principal tática de manejo integrado de pragas.

Segundo Douthett (1967), o controle biológico possui uma dimensão ecológica, utilizando o estado de equilíbrio do ecossistema, o qual envolve uma conceituação dinâmica, não necessariamente fixa, e a regulação requer os entendimentos dos princípios de dinâmica de populações, enfatizando suas bases ecológicas; para o mesmo autor o controle biológico é seguro, permanente e econômico. DeBach (1974) definiu o controle biológico como a ação dos inimigos naturais que mantêm a densidade populacional das pragas numa média mais baixa do que ocorreria na sua ausência. Van den Bosch et al. (1982) consideraram este método de controle um fenômeno natural, que pode promover solução relativamente permanente, harmônica e econômica.

O controle biológico natural, ou seja, aquele que ocorre naturalmente e sem a interferência do homem, assume grande importância em programas de Manejo Integrado (Gravena, 1992; Parra, 1993). Pode, também, ter muito valor o controle biológico aplicado, que engloba a introdução e manipulação de inimigos naturais pelo homem, visando reduzir danos provocados por pragas a níveis toleráveis (Van den Bosch et al., 1982).

A proteção e fomento dos inimigos naturais, sua introdução, aumento artificial e colonização; bem como propagação e disseminação representam a operacionalização do controle biológico. Higley et al. (1989) afirmaram que introdução, conservação e multiplicação são os três procedimentos básicos em controle biológico.

Os efeitos adversos decorrentes do uso de pesticidas, em alvos não visados, como o homem, animais domésticos, organismos selvagens, solo e água, risco de resíduos, polinizadores e inimigos naturais, devem ser eliminados ou minimizados para

evitar problemas indesejáveis. Entretanto, os pesticidas não podem ser excluídos do esquema de controle de pragas, uma vez que ainda representam a segurança para a implantação do sistema, devendo ser usados quando estiverem esgotadas todas as outras possibilidades de controle, de maneira emergencial (Metcalf, 1982).

Deverá ser observada sempre a especificidade para a praga em questão, evitando-se o uso de produtos de largo espectro e que não afetam os inimigos naturais (Batista, 1990). Para Croft & Brown (1975), está implícito no conceito de manejo integrado a maximização do uso de inimigos naturais de pragas, suplementado-a com inseticidas, quando necessário. Estes autores afirmaram que a ênfase na integração de métodos biológicos e químicos reflete o consenso no qual os inseticidas continuarão como parte de muitos programas de manejo, até que métodos alternativos efetivos sejam alcançados.

A seletividade de inseticidas a organismos benéficos permite a compatibilização do controle químico com o manejo integrado, e cuja utilização é possível para a maioria das culturas. Inseticidas e acaricidas seletivos, bem como herbicidas, fungicidas e outros produtos químicos e biológicos, devem ser preferidos, para que sejam alcançados os objetivos do manejo integrado (Degrande & Gomez, 1990).

O desenvolvimento de programas de controle integrado, baseados na compatibilização do uso dos métodos químicos e biológicos, tem recebido crescente atenção pelos pesquisadores em muitas partes do mundo (Riechert & Lockley, 1984; Jepson, 1989 e Hassan et al., 1991). Para os mesmos autores, pesticidas seletivos que possam ser usados no controle de pragas, sem afetar adversamente inimigos naturais importantes, são urgentes e necessários. De acordo com Gravena (1992), a seletividade de pesticidas é obrigatória no manejo integrado de pragas para que o controle biológico tenha pleno êxito.

Nos Estados Unidos, a seletividade de pesticidas para o manejo integrado tem sido determinada após o registro dos produtos; na Europa, procedimentos padronizados de experimentação, para determinar o risco dos pesticidas aos organismos benéficos, são parte da legislação de registro (Degrande & Hassan, 1996a).

Nos três últimos Congressos de Entomologia da Sociedade Entomológica do Brasil, abrangendo o período de 1989 a 1995, dos 2190 resumos publicados, 84 abordavam o tema seletividade de pesticidas a inimigos naturais e polinizadores, representando apenas 3,8% do total (Congresso Brasileiro de Entomologia, 1991, 1993, 1995). Em geral, a totalidade das metodologias utilizadas nesses trabalhos foram oriundas da criatividade e critérios individuais dos próprios pesquisadores.

A Comissão de Entomologia das Reuniões Regionais de Pesquisa de Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 1993a), que discute os critérios para a inclusão de inseticidas em programas de manejo integrado de pragas da soja com base em critérios de seletividade, apenas estabelece o tamanho mínimo de parcelas, método de amostragem, a relação dos inimigos naturais observados e confere uma escala de notas para os ensaios de campo. Atualmente é posicionamento da Comissão recomendar apenas inseticidas que sejam seletivos aos inimigos naturais das pragas da cultura.

Nas recomendações das Comissões Brasileiras de Pesquisa de Trigo, são apenas referidos os inseticidas que controlam as pragas, com o respectivo grau de toxicidade aos inimigos naturais, e apesar de um produto ser altamente tóxico a organismos benéficos, continua na recomendação (EMBRAPA, 1993b).

No Estado de São Paulo, Yamamoto et al. (1992) e o grupo de citricultura (De Negri, 1994) têm recomendações direcionadas para produtos seletivos.

Na cultura do algodão, são preferidos os inseticidas seletivos durante os oitenta dias iniciais de cultivo (Degrande, 1991).

Na olericultura ainda inexistente esta preocupação, assim como nas culturas do milho, arroz, feijão e outras de menor expressão econômica. Nestes casos, a escolha por um produto seletivo raramente tem valor na opção final de um produto a ser aplicado.

Ripper et al. (1951) conceituaram que o produto pode, basicamente, apresentar dois tipos de seletividade: a ecológica e a fisiológica. Na seletividade ecológica ocorrem diferenças de comportamento ou habitat entre as espécies, possibilitando que o produto entre em contato com determinada espécie e não com outra; baseia-se nas

diferenças ecológicas existentes entre pragas, inimigos naturais e polinizadores. Esse caso requer um conhecimento amplo dos aspectos bioecológicos das pragas e dos indivíduos benéficos. Pode-se conferir seletividade ecológica em função de uma tática de aplicação do produto químico. A seletividade fisiológica é inerente ao produto, e deve ser entendido o conjunto das condições determinantes da maior tolerância de um certo organismo, inimigo natural ou polinizador, em relação à praga, quando se encontram sob a ação de um produto. Se manifesta devido a diferenciação fisiológica entre pragas, predadores, parasitóides, patógenos e polinizadores, onde as pragas são mortas a uma concentração do produto que não afeta os indivíduos benéficos.

As bases bioquímicas da seletividade fisiológica foram discutidas por Graham-Bryce (1987), e concentram-se, em um ou mais dos seguintes processos biológicos: penetração, metabolismo e sensibilidade no sítio de ação. Acrescenta-se a estes a rota de distribuição e a ausência de interação com o alvo de ação (Welling & Paterson, 1985).

Croft & Brown (1975) fizeram uma revisão bibliográfica sobre respostas de artrópodos inimigos naturais a inseticidas, mostrando que neste tipo de estudo, o volume de investigações toxicológicas não era comparável, tanto em laboratório como no campo, a aqueles dirigidos as respostas das pragas. Contribuindo para esta ênfase diferenciada no controle de pragas, podem ser citados: 1) a atenção preferencial dada ao controle das pragas, do que a conservação dos organismos benéficos; 2) assumia-se que inimigos naturais respondem a inseticidas do mesmo modo que as pragas e seu estudo era desnecessário; 3) a desproporcionalidade entre a disponibilidade dos recursos financeiros para estudos de pragas comparada com os para inimigos naturais; 4) a dificuldade de criação em larga escala de predadores e parasitóides para experimentação detalhada; 5) a carência de métodos experimentais toxicológicos padronizados para inimigos naturais em relação aos desenvolvidos para avaliação de pragas. Em 1988, Croft (1990) demonstrou, através de um abrangente tratamento da temática "agentes de controle biológico de artrópodos e os pesticidas", a evolução neste novo campo da ciência, apresentando os resultados do "International Entomological Symposium" daquele ano.

Outro trabalho importante para o entendimento do avanço destes estudos foi o de Jepson (1989), que abordou o conhecimento sobre o efeito de pesticidas em invertebrados não visados, principalmente insetos. Foram descritas as abordagens existentes sobre a avaliação destes efeitos colaterais, a partir de pontos de vista legais, comerciais e de desenvolvimento internacional. No trabalho, discutiu-se a condução de protocolos formais para testar pesticidas em insetos não visados; a posição da indústria de pesticidas a respeito destes testes; consequências dos efeitos colaterais nas dinâmicas populacionais, suportado em bases ecológicas; a importância dos fatores temporais e espaciais na interpretação dos resultados; efeitos subletais de pesticidas em himenópteros parasitóides; análise de efeitos ecológicos e comportamentais; procedimentos para minimização dos efeitos não desejáveis; uso de doses reduzidas; estudos a longo prazo; e caminhos nos quais a informática pode contribuir na avaliação destes efeitos colaterais de pesticidas.

Graham-Bryce (1987) considerou como métodos para avaliar seletividade de pesticidas em inimigos naturais, as aplicações tópicas, exposições a superfícies tratadas, pulverizações diretas, imersões em soluções ou suspensões tóxicas, exposições a vapores e testes de alimentação.

Croft & Brown (1975) coletaram dados de toxicidade de inseticidas a inimigos naturais expressos em logaritmo da dosagem, como DL_{50} , e nos efeitos indiretos oriundos de intoxicações de espécies de pragas ou presas envenenadas. Abordaram fatores fisiológicos e ambientais afetando a suscetibilidade comparativa entre predadores, parasitóides, patógenos e pragas em aplicações diretas; como efeitos indiretos discutiram relações predador/presa e parasitóide/hospedeiro, efeitos de níveis subletais de inseticidas e a possibilidade de utilização de inimigos naturais resistentes.

Supõe-se serem mais práticos e coerentes os estudos feitos utilizando-se as já definidas dose/dosagens agronômicas (Hassan, 1994a), ao invés da metodologia apresentada por Croft & Brown (1975), baseada no uso da DL_{50} .

Os testes de toxicidade de pesticidas a organismos benéficos, também denominados testes de seletividade, efeito adverso ou efeito colateral, podem ser conduzidos em laboratório através de bioensaios. A bioanálise é um método toxicológico

usado para se obter respostas biológicas a partir de um dado estímulo. No caso da seletividade o estímulo geralmente é químico, enquanto a resposta pode ser medida em porcentagem de mortalidade, mudanças na capacidade benéfica, aumento no consumo de oxigênio, por exemplo. O efeito pode variar em função da quantidade do tóxico, tempo de exposição, temperatura, condições do ambiente e condições do organismo (Batista, 1974). De acordo com o autor os critérios para um bom bioensaio envolvem: a) linearidade entre dose (ou dosagem) e a resposta na linha ld-p; b) precisão na aplicação da dose; c) precisão na medição da resposta, sendo preferível resposta quantitativa que quadro final; d) os testes devem ser conduzidos em ambiente normal; e) permanecer constante fatores do ambiente, como temperatura, umidade e luminosidade; f) corrigir dados considerando a mortalidade natural de uma testemunha não tratada; g) escolher um solvente que não influencie os resultados.

Preferencialmente, as metodologias dos testes de laboratório devem mensurar a mortalidade, efeito residual e alterações na capacidade reprodutiva/benéfica da espécie. Para Busvine¹, citado por Ditttrich (1962), a reprodutibilidade de resultados e uma razoável simplicidade do método são critérios usados para julgar a adequação de uma metodologia. Segundo Franz et al. (1980), existem diversos motivos para preferir testes de laboratório, um deles é a reprodutibilidade de resultados, já que fatores externos e alguns internos podem ser mantidos constantes no laboratório. Para Hoy & Conley (1987), os experimentos laboratoriais dão informações reprodutíveis a um custo baixo.

Uma forma aproximada para entender a extensão das possíveis interações entre praga e inimigo natural é feita construindo e explorando modelos matemáticos populacionais (Hassel & Waage, 1984). De acordo com Waage et al. (1985), estes estudos da dinâmica das interações hospedeiro-parasitóide são estendidos à inclusão de aplicações de inseticidas. Outras técnicas utilizadas envolvem: a coleta de parasitóides e predadores no campo com posterior confinamento em superfícies tratadas (Bartlett, 1958; Lingren & Ridgway, 1967 e Bellows et al., 1985), indivíduos topicamente tratados (Lingren & Ridgway, 1967 e Jeppson et al., 1975); contagem, após a aplicação, do

¹ Busvine, J.R. The detection and measurement of insecticide resistance. In: *Proceedings of the International Congress of Zoology*, 15. 1958.

número de predadores presentes numa planta no campo, girando ao redor do vegetal durante um tempo fixo (Rosen & Gerson, 1965); aplicações de pesticidas seguidas de contagem do complexo de artrópodos não-alvo a campo (Nakano et al., 1994a, 1994b).

No Brasil, o estudo da seletividade tem sido objeto de discussão (Gravena & Lara, 1982; Alves, 1986; Degrande & Gomez, 1990; Gazzoni, 1994; Reis, 1996), sem no entanto se chegar a um senso comum quanto a uma metodologia, ou a uma padronização de procedimentos, para avaliar estes efeitos colaterais de pesticidas sobre organismos benéficos. É consenso que, nas condições brasileiras não existe uma padronização de procedimentos de pesquisa acurados, bem como inexistem normas estabelecidas sobre técnicas experimentais em seletividade.

Degrande & Gomez (1990) propuseram a priorização de um programa de pesquisa com seletividade de produtos químicos, dirigido a inimigos naturais chaves, através de experimentos de laboratório e campo, incluindo bioensaios com parasitóides e predadores. Estes autores sugeriram aplicações tópicas, ingestão e contato com presas/hospedeiros contaminados, avaliando os efeitos fumigante, desalojante e repelente, mudanças na capacidade benéfica e implicitamente a mortalidade. Sugeriram, também, experimentos com aplicações no campo em parasitóides e predadores, avaliando suas flutuações populacionais, ressurgência de pragas e surtos de pragas secundárias. Propuseram, ainda: a determinação da seletividade ecológica, como momento de aplicação, emprego de iscas tóxicas e aplicações localizadas; realizar bioensaios com patógenos de insetos e ácaros, medindo o efeito no crescimento e esporulação *in vitro*, efeito na inativação das unidades infectivas e na virulência; conduzir ensaios no campo em patógenos, avaliando o efeito dos químicos no momento da aparição de epizootias e sua intensidade, preservação no solo e efeitos indiretos, como surtos de pragas secundárias. Finalizaram propondo a realização de testes com polinizadores, através de aplicações tópicas, aplicações a campo avaliando a mortalidade e alternativas de horário de aplicação.

As vantagens e desvantagens de testes de laboratório e de campo a curto e longo prazo foram discutidas por Gazzoni (1994). O autor sugeriu técnicas de microaplicação, torre de pulverização, papel filtro impregnado, partes de plantas

contaminadas e inibição de entomopatógenos para os testes de laboratórios. Ensaio em blocos ao acaso, parcelas pareadas e as ilhadas são propostas para os testes de campo a curto prazo. Nos testes de campo a longo prazo sugere o acompanhamento de áreas grandes por uma ou mais safras. O autor conclui, no entanto, que as diversas metodologias de avaliação apresentadas não são definitivas, e constitui tarefa essencial no processo de investigação o seu aprimoramento constante, objetivando melhorar a precisão dos testes de seletividade.

Após a publicação da revisão feita por Croft & Brown (1975), muitas informações quanto a técnica de criação de artrópodos e metodologias para testes de seletividade tem sido publicadas: *Trichogramma cacoeciae* (Hassan, 1974, 1977), persistência (Hassan, 1980); *Encarsia formosa* (Hoogcarspel & Jobsen, 1984 e Oomen, 1985); *Leptomastix dactylopii* (Viggiani & Tranfaglia, 1978); *Phygadeuon trichops* (Plattner & Naton, 1975 e Naton, 1983); *Coccylomimus turionellae* (Bogenschütz, 1975; Bogenschütz, 1984 e Bogenschütz et al., 1986); *Pales pavidus* (Huang, 1981); *Chrysoperla carnea* (Suter, 1978); *Amblyseius potentillae* (Overmeer & Zon, 1982); *Phytoseiulus persimilis* (Samsoe-Petersen, 1983); *Typhlodromus pyri* (Boness et al., 1982); Carabidae (Heimbach, 1988); aranhas (Mansour & Nentwig, 1988); *Verticillium lecanii* (Tuset, 1975); *Anthocoris nemoralis* (Stäubli et al., 1984); *Aleochara bilineata* (Samsoe-Petersen, 1987). Os métodos para criação de dezesseis diferentes espécies de insetos e ácaros benéficos foram publicados por Samsoe-Petersen et al. (1989). Informações sobre criações de insetos no Brasil podem ser vistas em Parra (1990, 1992, 1996).

2.2 Concepção do Grupo de Trabalho 'Pesticidas e Organismos Benéficos'

Em 1974, foi formado um grupo de trabalho para cooperação científica internacional no estudo da seletividade de pesticidas a organismos benéficos: o "Working Group 'Pesticides and Beneficial Arthropods' of The International Organization for

Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)". Devido à inclusão de outros organismos, que não somente artrópodos, como fungos entomopatogênicos e anelídeos, em 1984 o nome do Grupo passou a ser "Pesticides and Beneficial Organisms" (Franz, 1975; Hassan, 1983).

Para este Grupo, parasitóides e predadores de pragas agrícolas reduzem a população de seus hospedeiros ou presas, contribuindo para limitar o dano causado pelas pragas, e em muitos casos previnem surtos de pragas, e contribuem para manter pragas secundárias abaixo do nível de dano econômico. O Grupo entende também que nas modernas recomendações de proteção de plantas, o uso de pesticidas químicos deve ser mínimo, entretanto se o uso de pesticida é indispensável, produtos seletivos devem ser escolhidos (Hassan, 1989; 1994a).

Um dos maiores objetivos do "Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'" é coordenar atividades internacionais, no desenvolvimento de métodos padronizados para testar os efeitos colaterais de pesticidas nos mais importantes inimigos naturais, e apontar aqueles pesticidas que são adequados para programas de manejo integrado (Hassan, 1994a). Para o mesmo autor, que é o coordenador daquele Grupo de Trabalho, o teste dos efeitos colaterais de pesticidas em organismos benéficos tem se tornado obrigatório em diversos países, fazendo com que se estabeleçam linhas de ação internacionalmente aprovadas e cada vez mais urgentes; também é preciso oferecer estas informações para os usuários de programas de manejo integrado.

De acordo com Hassan (1989) e Hassan et al. (1991), 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 princípios aprovados internacionalmente; b) organizar programações internacionais conjuntas para testar o efeito secundário de pesticidas nos organismos benéficos; c) estabelecer uma cadeia de laboratórios de testes 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. Basicamente, cada membro ativo do Grupo está envolvido com a

criação de insetos, desenvolve métodos de pesquisa em seletividade e participa dos programas conjuntos de pesquisa (*Joint Pesticide Testing Programme*), onde a maioria deles conduz estudos com uma espécie (Hassan, 1989).

O programa adotado pela IOBC propõe testes de laboratório, semi-campo e campo, conduzidos em seqüência; classificando os pesticidas em classes (de 1 = inócuo até 4 = nocivo) em função do efeito. De acordo com Hassan (1994a), cada um dos membros do Grupo de Trabalho desenvolve a criação e métodos experimentais com um inimigo natural, submetendo-os ao Grupo para análise. A classificação é dada para 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.

Os testes de laboratório são subdivididos em função dos seus objetivos: a) experimentos com o estágio de vida mais vulnerável (mais afetado, ou mais exposto) do organismo benéfico; b) experimentos com o(s) estágio(s) de vida menos vulnerável(eis) do organismo benéfico; c) experimentos de medição da duração da atividade prejudicial do pesticida (persistência); d) experimentos laboratoriais ampliados. Os de semi-campo são conduzidos em condições que se assemelham a aquelas de campo, como os de casas de vegetação, telados e gaiolas. Os de campo, por sua vez, são realizados com organismos de ocorrência natural ou liberados (Hassan et al., 1985, 1987, 1988, 1991, 1994; Samsoe-Petersen et al., 1989; IOBC/WPRS, 1988, 1992).

Estes autores, citados no parágrafo anterior, preconizaram a realização dos testes primeiro em laboratório. Produtos considerados inócuos a determinado inimigo natural, num teste de laboratório, são possivelmente mais inócuos ainda em testes de campo ao mesmo inimigo natural. Afirmam que exceções a esta regra são raras, e não se justifica estabelecer testes de rotina básica. A inocuidade de um produto pode ser facilmente demonstrada em experimentação de laboratório, entretanto sua toxicidade somente poderia ser confirmada sob condições de campo.

Os testes de laboratório, com o(s) mais vulnerável(eis) dos estágios de vida do inseto, submetem a espécie a uma situação muito drástica, expondo-a numa condição de máximo contato com a mais elevada dosagem agronômica. Os testes de

laboratório têm a função de submeter o pesticida à prova de inocuidade (ausência de toxicidade), separando os inócuos dos pouco nocivos. Os laboratoriais com o(s) estágio(s) de vida menos vulnerável(eis) permite(m) diferenciação entre preparados nocivos. Enquanto que os de laboratório que mensuram a duração da atividade prejudicial do pesticida (persistência), ajudam estimar o risco, uma vez que o impacto do pesticida no campo é grandemente afetado pela sua persistência. Produtos nocivos, mas com vida curta poderiam ser usados com sucesso em programas de manejo integrado. Os experimentos laboratoriais ampliados contribuem para estimar o risco sob condições simuladas de campo. Nos testes de semi-campo e campo é possível avaliar o risco do pesticida, proporcionando informações relevantes para a prática (Hassan, 1994a). Para avaliar o valor prático dos diferentes tipos de métodos, comparações de resultados são feitas por diversos membros do Grupo (Hassan, 1989).

Os programas conjuntos de pesquisa do Grupo são organizados a cada dois anos, e testa cerca de vinte pesticidas de interesse comum, numa variedade de organismos benéficos, e usando os métodos padronizados. Algumas atividades e resultados dos trabalhos experimentais conjuntos, conduzidos pelo Grupo, nos últimos anos, estão resumidas em nove publicações, as quais envolveram 29, 21, 20, 14, 22, 23, 21, 29 e 24 autores (Hassan et al., 1985, 1987, 1988, 1991, 1994; Samsoe-Petersen et al., 1989 e IOBC/WPRS, 1988, 1992).

O Grupo de Trabalho da IOBC tem atualmente (Hassan, 1994a) o propósito de intensificar o desenvolvimento de outras metodologias padronizadas de testes. Um trabalho de pesquisa encontra-se em andamento para desenvolver e racionalizar os métodos de semi-campo e campo. O Grupo reconhece que nenhum teste isolado pode estabelecer suficiente informação para avaliar os efeitos colaterais de pesticidas em organismos benéficos. Através de cooperação internacional, o número e o alcance dos métodos podem ser incrementados, e a capacidade para conduzir testes pode ser maximizada. A experiência acumulada durante os programas conjuntos de experimentação tornará possível ao Grupo recomendar viáveis combinações de métodos para o teste do efeitos colaterais de pesticidas. O uso de diferentes tipos de testes, será decidido, na prática, na base da necessidade e dos meios disponíveis.

2.3 *Trichogramma*

Parasitóides do gênero *Trichogramma* têm distribuição mundial e são importantes por parasitarem ovos de lepidópteros pragas. O uso de *Trichogramma* no controle biológico tem aumentado a cada ano em diversos países. Cerca de 18 diferentes espécies estão sendo criadas massalmente, em mais de 16 países, para controlar pragas do milho, cana-de-açúcar, arroz, algodão, soja, beterraba açucareira, hortaliças e pinheiros (Hassan, 1994b).

O ovo do parasitóide é inserido no ovo do hospedeiro e sua larva alimenta-se da massa vitelina e/ou do embrião do hospedeiro. *Trichogramma* possui três instares larvais saciformes, pré-pupa e pupa. No início do terceiro instar larval, os ovos do hospedeiro tornam-se pretos, em decorrência da deposição de grânulos próximos da superfície do córion.

Stein (1961), Ulrich (1968), Franz & Fabritius (1971), Hassan & Franz (1973), Hassan (1974, 1977, 1980), Degrande & Hassan (1996b) fizeram estudos para definir métodos de avaliação do efeito de pesticidas em *Trichogramma*. O estágio adulto desta espécie é o mais vulnerável aos pesticidas durante as aplicações, enquanto que o de pupas corresponde ao estágio menos vulnerável (Hassan, 1988; 1992).

Reconhecendo que nenhum teste isolado pode prover suficiente informação para classificar o efeito adverso de um pesticida em um organismo benéfico, o Guia da IOBC (Hassan, 1992) apresentou um esquema sequencial que envolve três testes de laboratório e um de campo.

O Guia da IOBC (Hassan, 1988; 1992) combina dois métodos experimentais de laboratório e um em condições de laboratório-ampliado, que são aplicados em sequência: (a) exposição (contato) dos adultos de *Trichogramma* a um filme do pesticida aplicado em placas de vidro; (b) pulverização direta de pupas dentro do ovo do hospedeiro; (c) exposição (contato) de adultos de *Trichogramma* em folhas de videira tratadas, a diferentes intervalos após a aplicação do pesticida, com sua degradação sob condições de campo. De acordo com o mesmo Guia, o primeiro teste de laboratório

(a) prova se o produto é inócuo. Produtos considerados inócuos neste teste são inócuos a campo, com raríssimas exceções. Nesse caso a continuidade dos testes não é preconizada. Testes utilizando os métodos (b) e (c) são necessários quando o pesticida foi classificado como nocivo ou moderadamente nocivo no teste (a). Apesar da inocuidade de um produto ser facilmente demonstrada em experimentação de laboratório, a toxicidade somente pode ser confirmada sob condições da prática de campo. Os testes sob condições práticas de semi-campo ou campo são recomendados quando o pesticida foi classificado como nocivo ou moderadamente nocivo no teste (b), persistente ou moderadamente persistente no teste (c). Produtos não classificados pelos testes de laboratório são testados no semi-campo e campo, comparando-os novamente com um “inócuo” e outro “nocivo” considerados referenciais, objetivando classificá-los definitivamente.

2.4 *Chrysoperla carnea*

Entre os crisopídeos existem dois diferentes grupos em relação ao hábito alimentar. O primeiro agrega aquelas espécies cujas larvas e adultos são predadores, enquanto o segundo inclui espécies que alimentam-se de outros artrópodos apenas na fase larval. Adultos de *C. carnea* alimentam-se de *honeydew* e pólen.

A fêmeas depositam os ovos isoladamente em folhas e ramos. Os três estádios larvais são predadores polípagos, muito móveis e ocorrem naturalmente na maioria das culturas. As larvas predam principalmente pulgões, mas também ovos de outros artrópodos, pequenas lagartas, cochonilhas, ácaros e outros artrópodos de corpo tenro.

A escolha de *Chrysoperla* como a espécie representativa de Chrysopidae, feita pelo Grupo de Trabalho da IOBC/WPRS, nos estudos de seletividade deve-se: a) distribuição cosmopolita; b) é uma espécie que ocorre na maioria das culturas e habitats

naturais; c) tem importante papel limitando pragas de plantas cultivadas; d) fácil de ser criada em grande número.

Suter (1978), Hassan et al. (1985), Vogt (1992) fizeram estudos para definir métodos de avaliação do efeito de pesticidas a *C. carnea*.

As larvas devem ser mantidas individualizadas, nos testes, por causa do comportamento canibal. Existe uma próxima relação linear negativa ($r = 0,97$) entre consumo de presas e mortalidade larval/pupal, conseqüentemente, o método foi simplificado, computando-se apenas a mortalidade pré-imaginal, ao invés do consumo alimentar. Corrigindo estes valores com a testemunha, obtém-se a mortalidade do tratamento. A média na produção de ovos por fêmea é calculada e comparada com aquelas da testemunha. Deve-se mensurar o efeito total do pesticida, combinando os efeitos do pesticida na mortalidade com a fecundidade e a fertilidade que foram afetadas pela exposição (contato) do estágio pré-imaginal aos pesticidas (Hassan et al., 1985).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos consistiram na aplicação da metodologia laboratorial padrão da IOBC sobre um parasitóide (*Trichogramma cacoeciae*) e um predador (*Chrysoperla carnea*), e buscavam seu aprimoramento. Experimentos desta pesquisa obedeceram a metodologia estabelecida pela "International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants", conforme Hassan et al. (1985, 1987, 1988, 1991, 1994); Samsoe-Petersen et al. (1989) e IOBC/WPRS (1988 e 1992), e foram conduzidos nos laboratórios do *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* (BBA), *Institut für biologischen Pflanzenschutz*, Alemanha, durante um ano, no período de 27 de abril de 1995 a 22 de abril de 1996.

Os trabalhos com populações das duas espécies fizeram parte da programação oficial dos experimentos em rede do BART ("Beneficial Arthropod Regulatory Testing Group) e do *VIII Joint Pesticide Testing Programme* do "Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'" da IOBC, com base nos Guias com as recentes validações feitas pela IOBC e com o aval do BART, EPPO/CoE ("European and Mediterranean Plant Protection Organization with the Council of Europe") e SETAC ("Society of Environmental Toxicology and Chemistry - Europe"). Conduzidos submissamente por princípios de boa prática laboratorial (GLP), foram experimentos que tiveram objetivos claros e conhecidas as maiores fontes de variação, as quais puderam ser controladas no planejamento experimental.

A experimentação em ambiente com boa prática laboratorial (GLP) tem sido introduzida nos laboratórios participantes, especialmente se os estudos forem submetidos a autoridades governamentais. Basicamente, os princípios de GLP estão relacionados com: condições de pessoal, programas de qualidade, facilidades, equipamentos e reagentes, sistemas de teste, conhecimento do(s) pesticida(s) em teste, procedimentos operacionais padronizados, performance do estudo, interpretação e relato dos resultados, destino e retenção dos resultados/materiais.

Nos experimentos em rede, os protocolos experimentais são completos, com ênfase à descrição de detalhes, compreensíveis e sem ambigüidade, para reduzir o risco de diferentes interpretações; o número de laboratórios participantes é suficiente para permitir estudos conjuntos dos resultados, assim como diferentes países representados em cada teste. É na execução dos experimentos em rede que se propõe e testam aprimoramentos da corrente metodologia, uma vez que os métodos não são permanentes.

As atividades com o parasitóide foram mais intensas, devido a demanda e ao volume de trabalhos com *T. cacoeciae* no BBA.

Foram considerados os seguintes aspectos na realização dos testes:

3.1 Experimentos com *Trichogramma cacoeciae*

Foram conduzidos experimentos com: adultos de *T. cacoeciae* (experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8); ovos (experimento 9); larvas (experimento 10); pupas (experimento 11); um experimento de persistência (laboratório-ampliado).

3.1.1 Toxicidade em adultos

3.1.1.1 Pesticidas-teste

As características dos pesticidas em teste, como o nome comercial, nome do ingrediente ativo, nome químico, fabricante, concentração do ingrediente ativo no produto comercial, quantidades utilizadas neste estudo, formulação, cor, data de validade e condições de armazenamento foram conhecidas antes da instalação dos experimentos.

3.1.1.2 Pesticida da testemunha positiva

O pesticida Afugan 300 (0,4%) foi escolhido para ser a testemunha positiva dos experimentos, por ser reconhecidamente nocivo a espécie em teste. As informações da testemunha positiva estavam em acordo com o rótulo da embalagem.

3.1.1.3 Medidas de segurança no manuseio dos pesticidas

Procedimentos de higiene de rotina foram suficientes para garantir a saúde e segurança pessoal.

3.1.1.4 Procedência dos insetos teste

Trichogramma cacoeciae foi escolhido para os testes, coletado na região de Darmstadt em 1993. Nesta espécie ocorre partenogênese telítica (Hassan, 1988). Outras espécies de *Trichogramma* poderiam ser testadas com a mesma metodologia. Não foram feitos estudos com espécies brasileiras neste trabalho devido ao tempo disponível para a execução do trabalho; caso fosse feita a importação para a Alemanha, além da espera pelo serviço quarentenário daquele País, seria necessário iniciar uma criação com a(s) nova(s) espécie(s) no laboratório e alterar o esquema de produção lá implantado, por exemplo. Além disso, o treinamento com a espécie *T. cacoeciae* tem validade para outras espécies do grupo.

O estudo foi conduzido com indivíduos criados e mantidos em condições padronizadas, descritas em 3.1.1.6, nas dependências do Laboratório de Criação de *Trichogramma* do BBA. Somente indivíduos de mesma idade foram utilizados nos estudos.

3.1.1.5 Gaiolas de contato dos insetos com o pesticida

Os recipientes experimentais (gaiolas de contato) utilizados no teste foram construídos com uma moldura quadrada de alumínio (13 x 1,5 x 1 cm de cada lado) e duas placas de vidro de 2 mm (13 x 13 cm), as quais serviram de fundo e cobertura desta gaiola de contato.

Fitas de espuma plástica de 9 mm de largura, auto-adesiva em uma das faces, era fixada na moldura de alumínio para acomodar as placas de vidro.

Em três dos lados da moldura de alumínio existiam seis orifícios para ventilação ($\varnothing$ aproximado de 1 cm). Uma cobertura com tecido fino preto, aderido firmemente e internamente com fita adesiva, cobria estes orifícios e permitia a troca de ar.

No quarto lado da moldura de alumínio haviam dois orifícios (aberturas): o maior (3,5 x 1 cm) era utilizado para introduzir ovos do hospedeiro a serem parasitados e alimento dos insetos em teste; o menor ($\varnothing$ aproximado de 1 cm) servia para inserir os indivíduos a serem testados, e era denominado orifício de conexão dos tubos de emergência. Este quarto lado da moldura foi coberto externamente com uma fita colante, protegida na altura dos referidos orifícios com outra fita anti-aderente prevenindo adesão e imobilidade dos insetos. Funcionava como uma porta que permitia a abertura e o fechamento quando era necessário inserir os adultos ou ofertar os ovos hospedeiros para o parasitismo.

As duas superfícies das placas de vidro, com o filme seco do pesticida, formaram o fundo e a cobertura interiores da gaiola. A superfície exterior (não tratada) das placas de vidro foram cobertas com papel cartão preto, que tinha um quadrado central (7 x 7 cm) removido, constituindo a área de contato dos insetos com o pesticida em teste, em função da atratividade da luz sobre a espécie. Assim, os insetos ficavam ativos na superfície de vidro exposta a luz, maximizando a exposição ao pesticida em teste.

Um pedaço de papel (1 x 2 cm), com três finos filetes de alimento para os adultos (composto por 3 g de gelatina mais 100 ml de água destilada em 200 g de mel Langnese) feitos com uma seringa de farmácia, foi colocado na montagem de cada gaiola.

Cada gaiola foi mantida fixa por duas presilhas, identificada e constituiu-se numa repetição (Figura 1 e Apêndice 4)

Figura 1: Representação da gaiola de contato para os testes com *Trichogramma* (dimensões em milímetros).

3.1.1.6 Criação e manutenção dos indivíduos

3.1.1.6.1 Material biológico para o teste

Uma unidade experimental consistia de uma gaiola de contato com 350 ± 50 adultos de *Trichogramma*. Para cada tratamento (quatro repetições) os seguintes materiais eram necessários:

- cartões de papel com ovos de *Sitotroga cerealella* parasitados (população inicial de *T. cacoeciae*) (Apêndice 6);
- cartões de papel com ovos frescos de *S. cerealella* (para mensurar os resultados) (Apêndice 5);
- alimento para os adultos de *T. cacoeciae* (item 3.1.1.6.4), acondicionado em seringa de farmácia de 5 ml e conservado em geladeira a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.1.1.6.2 Criação dos insetos

3.1.1.6.2.1 *T. cacoeciae*

Adultos de *T. cacoeciae* foram criados em cilindros de vidro, com 25 cm de comprimento por 10 cm de Ø, mantidos em sala climatizada ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 15\%$ UR, fotofase de 16 horas a 500 Lux). Foram oferecidos ovos de *S. cerealella* como hospedeiro e alimento três vezes por semana. Um terço dos ovos parasitados foram mantidos nos cilindros com o objetivo de dar continuidade na criação, os 2/3 restantes eram comercializados em programas de controle biológico.

3.1.1.6.2.2 *S. cerealella*

Grãos de trigo isentos de inseticida foram misturados com água e aquecidos em estufa a 98°C por aproximadamente 6 horas. Este procedimento ajudava desinfetar e amolocar os grãos. O trigo era espalhado em caixas plásticas, esfriado, colocado em quadros telados e infestado com ovos de *S. cerealella*, colocando-as em incubadora por duas semanas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR = $70 \pm 10\%$. Os quadros com grãos infestados foram colocados em gaiolas, em outra sala ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR = $70 \pm 10\%$), e as mariposas que emergiam eram coletadas. O início da emergência deu-se em cerca de 14 dias.

Os ovos foram coletados colocando-se os adultos em um cilindro que continha uma tela de aço inoxidável para postura. Para maiores informações ver Neubecker (1967) e Hassan (1996).

3.1.1.6.3 Confecção dos cartões com ovos do hospedeiro (Apêndice 5 e Apêndice 6)

Ovos frescos de *S. cerealella* (idade de 1 dia), obtidos na criação massal da espécie no BBA-Darmstadt, foram colados em papel (círculos com $\varnothing = 10$ mm para a população inicial dos tubos de emergência - Apêndice 6; $\varnothing = 15$ mm para o parasitismo nas gaiolas - Apêndice 5). O adesivo utilizado foi *Tragant keimarm (fein gepulvert)* Merck®, Darmstadt, DAB 7, artigo 8405, baseado na planta *Tragacanth*, na razão de 3 g do produto em 50 ml de água destilada, conservado em frasco fechado e em geladeira quando não estava sendo utilizado. Após o preparo, era válido por 3 semanas após o preparo, e não tóxico ao *T. cacoeciae* (Hassan, 1977).

Em uma câmara com sistema de exaustão de ar, aplicava-se o adesivo através de um molde plástico e pincel. Distribuía-se uniformemente ovos previamente

peneirados (peneira de malha com 0,5 mm) e isentos de fragmentos de *S. cerealella*, confeccionando-se os cartões de papel com círculos de ovos, de acordo com o item 3.1.1.6.1.

3.1.1.6.4 Composição e conservação do alimento dos adultos de *T. cacoeciae*

Composto por 3 g de gelatina mais 100 ml de água destilada em 200 g de mel Langnese, acondicionado em seringa de farmácia de 5 ml e conservado em geladeira a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.1.1.7 Aplicação dos tratamentos

O pesticida em teste, na concentração indicada (a mais elevada concentração de registro e/ou outra sugerida), era aplicado na diluição máxima de 200 litros por hectare. O equipamento utilizado para as pulverizações foi um pulverizador estacionário de laboratório com pressão constante (2,7 bar). O tamanho das gotas estava entre 50 e 200 μm . O equipamento permitia padronização e reprodutibilidade da aplicação.

Durante as pulverizações as zonas marginais das placas de vidro foram protegidas por uma armação plástica (14 x 14 cm), de forma que somente a área central (10 x 10 cm) foi impregnada com a calda do pesticida. Isto prevenia a contaminação das molduras de alumínio e/ou a espuma plástica da gaiola.

Cada placa de vidro foi pulverizada com um máximo de $200 \text{ mg}/100\text{cm}^2 \pm 10\%$ (correspondendo ao máximo de 2 mg de calda por cm^2 de superfície da placa, equivalente a 400 mg de calda por gaiola). Todas as pulverizações ficaram entre 1,5 a 2,0

mg/cm², com a calda aplicada cobrindo cerca de 80% da área da placa de vidro tratada. Apenas um lado da placa foi pulverizado. A quantidade aplicada na pulverização foi controlada pela pesagem em balança analítica de todas as placas, imediatamente antes e depois da pulverização.

As placas de vidro tratadas ficaram a temperatura ambiente por 2 a 3 horas para secagem completa da calda aplicada, quando então foram confeccionadas as gaiolas (ver item 3.1.1.5).

3.1.1.8 Tratamentos, parcela e repetições

Os tratamentos (item 3.4) foram, normalmente, 3: pesticida em teste (tratamento), água de torneira (testemunha negativa) e outro pesticida reconhecidamente nocivo com classe 4 pela IOBC (testemunha positiva). Cada parcela consistiu de uma gaiola de contato (item 3.1.1.5). Os experimentos foram inteiramente casualizados ($\alpha = 0,05$) e delineados com três ou quatro repetições para cada tratamento.

3.1.1.9 Infestação

Os tubos de emergência, contendo adultos ativos e com um dia de idade, foram escurecidos com capas feitas de papel cartão preto (Apêndice 3). Os adultos de *T. cacoeciae* foram introduzidos na respectiva gaiola de contato através do orifício de conexão dos tubos de emergência (ver item 3.1.1.5 e 3.1.1.15).

Durante o período de tempo que os tubos de emergência ficaram encapados e conectados, os adultos, atraídos pela luz, dirigiram-se para o interior das gaiolas iluminadas (ver condições climáticas experimentais, item 3.1.1.16).

Os tubos ficaram conectados nas gaiolas até a manhã do dia seguinte (12-14 h), quando então foram retiradas as capas pretas, fechados com tecido e anéis de borracha, e colocados em incubadora por mais três dias nas mesmas condições do teste.

3.1.1.10 Cálculo da população inicial de *T. cacoeciae*

Após serem desconectados, os tubos de emergência sem a capa preta foram fechados, ficaram acondicionados na incubadora por mais três dias para que todos os parasitóides remanescentes emergissem, e depois, transferidos para estufa a 70°C por 30 minutos. Essa medida foi adotada para matar todos os adultos e facilitar a contagem.

A população inicial de *T. cacoeciae* foi calculada pelo exame do tubo de emergência. Todos os ovos de *S. cerealella* parasitados (que tornaram-se pretos) foram contados e o número de adultos remanescentes no tubo e aderidos no alimento foi subtraído. As contagens foram feitas em microscópio estereoscópio.

3.1.1.11 Oferta de ovos hospedeiros para parasitismo

Após a desconexão dos tubos de emergência da gaiola, aguardou-se um período de 6 horas para oferecer os primeiros ovos de *S. cerealella* a serem parasitados.

Nos casos em que não foram encontrados adultos sobreviventes nas gaiolas, após as 6 horas, os ovos hospedeiros não foram oferecidos, e o tratamento era considerado como 100% de mortalidade.

Ao longo do experimento cerca de 18.000 ovos de *S. cerealella* por gaiola foram oferecidos para parasitismo (Apêndice 8), como segue: no segundo dia (dia seguinte ao tratamento) três cartões de papel, contendo três círculos de ovos de *S.*

cerealella por cartão (1000 ± 200 ovos em cada círculo). No terceiro dia foram oferecidas dois cartões de papel e no quinto, apenas um cartão. Esta padronização do número de ovos oferecidos passou a ser feita a partir deste trabalho, e baseou-se na capacidade de parasitismo da espécie, com minimização da competição intra-específica.

Os cartões foram confeccionadas com ovos frescos (idade de 1 dia) de *S. cerealella* aderidos, para facilitar o manuseio.

Nos cartões de papel, além dos ovos de *S. cerealella*, foi aplicado alimento com uma seringa, na forma de dois finos filetes dispostos no sentido da largura do cartão (Apêndice 7). Estes cartões foram colocados sempre na projeção da área iluminada das gaiolas (Apêndice 4), através do maior orifício de abertura. Os novos cartões eram colocados sobre aqueles dos dias anteriores.

3.1.1.12 Desmontagem das gaiolas

Sete dias após a aplicação (fim dos períodos de contato e reprodutivo) as gaiolas foram desmontadas.

Os cartões de papel (Apêndice 7 e Apêndice 8) foram preservados entre folhas de papel toalha, e incubados nas mesmas condições do teste por mais três dias, até que todos os ovos parasitados se tornassem pretos porém sem a emergência de adultos. A zona do alimento no cartão foi removida, cortando-a, para prevenir que um cartão não colasse no outro.

3.1.1.13 Cálculo da eficiência de parasitismo

O número de ovos hospedeiros parasitados (pretos) em cada tratamento foi contado com auxílio de um microscópio estereoscópio. Os ovos pretos (Apêndice 7 e

Apêndice 8) foram contados nos cartões de papel entre 8 e 9 dias após a introdução do cartão na gaiola. Durante este tempo os ovos tornaram-se pretos e facilmente reconhecíveis. Após a eclosão das lagartas de *S. cerealella* os ovos não parasitados tornavam-se amarelo-transparentes.

Quando os ovos não foram contados até o décimo primeiro dia após o parasitismo, foram submetidas a 70°C por 30 minutos, para contagem posterior. Com isto evitou-se a emergência de adultos de *T. cacoeciae* sem afetar a coloração preta dos ovos parasitados.

Com os dados obtidos no item 3.1.1.10 (população inicial de *T. cacoeciae*) calculou-se a taxa de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* em cada tratamento.

A redução no parasitismo dos adultos submetidos aos pesticidas, comparada com a testemunha negativa (água de torneira), foi utilizada para medir o efeito do pesticida.

3.1.1.14 Controle de qualidade de *T. cacoeciae*

As populações de *T. cacoeciae* mantidas em laboratório e que forneciam os insetos para a população inicial do teste foram submetidas ao programa de controle de qualidade do IOBC (*Global Working Group 'Quality Control of Mass Reared Arthropods'*). As avaliações foram feitas a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, UR = $75 \pm 10\%$ e fotofase de 16 horas, determinando a obtenção das seguintes informações nos testes de rotina: hospedeiro de alimentação, identificação da espécie e conhecimento da procedência e número de gerações no laboratório, taxa de parasitismo, porcentagem de emergência, razão sexual, número de fêmeas, fecundidade e taxa de parasitismo no hospedeiro natural (*Cydia pomonella*). Ver um exemplo da aplicação do programa da IOBC de controle de qualidade de *Trichogramma*, para os experimentos, no Apêndice 1.

3.1.1.15 Preparo dos tubos de emergência

O preparo dos tubos de emergência (Figura 2) iniciava-se sempre 11 dias antes da instalação do experimento, quando cartões de papel com círculos ($\varnothing = 10$ mm) de ovos de *S. cerealella* eram colocados na criação massal para serem parasitados durante 24 horas. Posteriormente eram retirados da criação, possíveis adultos remanescentes eliminados, e então acondicionados em caixas plásticas (18 x 13 x 7 cm), com tampa, nas mesmas condições climáticas do experimento para o desenvolvimento.

Após 7 dias, equivalente a dois dias antes da emergência, os tubos de emergência eram definitivamente confeccionados.

Cada tubo de emergência foi constituído por um ampola de vidro transparente (120 mm de comprimento x 20 mm de $\varnothing$ em uma das extremidades e 7 mm na outra). No seu interior, um dos círculos de ovos parasitados era aderido a uma tira de papel (80 x 15 mm) com três finos filetes de alimento. O alimento ficou condensado e a espessura do filete não permitia a aderência dos adultos emergentes. Os tubos foram fechados com tecido de algodão branco em cada ponta, numa fixava-o com um elástico, na outra com anel de borracha.

Três dias depois, adultos com 24 h de idade estavam disponíveis para a infestação.

Figura 2: Representação do tubo de emergência para a infestação da população inicial (dimensões em milímetros).

3.1.1.16 Condições climáticas experimentais

As gaiolas de contato (parcelas) foram mantidas em incubadora Rumed[®] (Rubarth and Co., Hannover, Alemanha) nas seguintes condições: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 15\%$ UR; foi fornecida luz fraca, difusa e contínua (24 h), cerca de 500 Lux, na parte superior da incubadora. A luz contínua determinou a permanência dos parasitóides no centro iluminado da gaiola, evitando contato com locais escurecidos e não tratados da gaiola.

Durante as três primeiras horas após a conexão dos tubos de emergência, a intensidade luminosa foi acrescida para 2.500 Lux (correspondente a 5 lâmpadas Osram[®] L 36 W/21 Lumilux Branca T6), para tornar a saída dos insetos dos tubos mais rápida, retornando depois a 500 Lux (1 a 2 lâmpadas).

Para evitar o acúmulo de vapores de pesticida nas gaiolas, o ar interno foi continuamente retirado por bombas de sucção/compressores de ar (Wisa D.B.G.M., Alemanha). O possível ar contaminado foi retirado por sucção da gaiola e o ar fresco pôde entrar. O sistema com bomba de sucção, mangueiras e conexões (Apêndice 4) foi instalado imediatamente após a montagem das gaiolas. A bomba de sucção estava calibrada para promover a renovação total do ar da gaiola a cada 1 a 2 minutos, e dimensionada na razão de uma bomba para 4 a 8 gaiolas.

3.1.1.17 Distribuição cronológica das atividades

Na Figura 3 encontra-se a distribuição das atividades semanais na execução dos principais procedimentos experimentais.

	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo
1ª semana				inserção dos ovos hospedeiros na criação	retirada dos ovos parasitados (24 h)		
2ª semana					preparo dos tubos de emergência		emergência principal de <i>Trichogramma</i>
3ª semana	pulverização das placas de vidro, confecção das gaiolas, conexão dos tubos de emergência	desconexão dos tubos de emergência, inserção de ovos hospedeiros (2º dia), após 6 horas	inserção de ovos hospedeiros (3º dia)	contagem da população inicial (nos tubos de emergência), ou matar para contar depois	inserção de ovos hospedeiros (5º dia)		
4ª semana	final do teste, coleta dos ovos hospedeiros			contagem dos ovos parasitados, ou matar para contar depois			

Figura 3 - Cronologia dos procedimentos nos testes com *Trichogramma*

3.1.2 Toxicidade em pupas

Pupas de *T. cacoeciae* localizadas em ovos hospedeiros (o estágio de vida que é menos vulnerável ao pesticida) (Apêndice 6) foram diretamente pulverizadas com o produto. A capacidade de parasitismo de adultos emergentes do tratamento foi comparada com a testemunha (água de torneira).

Ovos de *S. cerealella* com 1 dia de idade aderidos em papel, em discos de 1,0 cm de diâmetro, foram expostos a parasitismo por *T. cacoeciae* por 24 h. Os ovos parasitados foram deixados para se desenvolver nas mesmas condições da criação (3.1.1.6.2), até a fase de pupa dos *Trichogramma*.

Tratamentos: pesticida(s) em teste e testemunha (água de torneira), ver item 3.4. Parcela: um disco de ovos com 450 ± 100 pupas. Repetições: 4. Delineamento: inteiramente casualizado ($\alpha = 0,05$).

Os tratamentos foram aplicados no sétimo dia após o parasitismo, quando as pupas já haviam se formado, pulverizando-se 4 discos com pupas dentro dos ovos de *S. cerealella*. Os procedimentos de pulverização, concentração e quantidades aplicadas

foram os mesmos descritos para o experimento com adultos (3.1.1.7), entretanto pulverizando-se ovos de *S. cerealella* parasitados.

Após a pulverização, as pupas tratadas, que estavam inseridas dentro dos ovos hospedeiros, foram deixadas para secar por 3 horas, transferidas para novos recipientes e deixadas para que o desenvolvimento ocorresse, nas mesmas condições experimentais da criação (3.1.1.6.2).

Dois dias antes da emergência dos adultos, os ovos pretos contendo *Trichogramma* foram transferidos para os tubos de emergência, obedecendo a mesma metodologia de testes para toxicidade em adultos (3.1.1.15)

Aos parasitóides sobreviventes e emergentes, quando existentes, foram ofertados ovos de *Sitotroga* para avaliar a capacidade de parasitismo (3.1.1.11). As mesmas gaiolas foram utilizadas, como no experimento com adultos, porém sem tratar as placas de vidro (3.1.1.5).

A mensuração dos resultados foi feita através da redução na capacidade de parasitismo das fêmeas oriundas das pupas tratadas em relação a testemunha.

3.1.3 Persistência em adultos (laboratório-ampliado)

Esta parte do trabalho fez parte do *VIII Joint Pesticide Testing Programme* da IOBC. Pesticidas que obtiveram Classes 3 e 4 (toxicidade em adultos) são submetidos ao teste de persistência.

Para avaliar a duração da atividade tóxica (persistência) os tratamentos (ver item 3.4) foram aplicados em videiras cv. Müller-Thurgau, cultivadas em vasos sob condições de casa de vegetação. As plantas estavam com 20-40 cm de altura e com cerca de 10 folhas quando tratadas (Apêndice 2).

Após a secagem e envelhecimento do resíduo sob condições de campo, por determinado período de tempo, adultos de *Trichogramma* foram expostos aos resíduos das folhas em gaiolas de contato e a capacidade de parasitismo foi obtida.

As plantas foram mantidas no campo sob uma cobertura de polietileno transparente (50-100 cm de altura das plantas) fixada em uma estrutura de madeira, que protegia as plantas da chuva (Apêndice 2). Também era facilmente montada e desmontada, permitindo as plantas receberem insolação direta. A exposição das plantas à insolação direta era feita uma vez por semana, durante 3 horas.

Tratamentos: pesticida(s) em teste e testemunha (água de torneira). Parcela: uma gaiola de contato, como descrita na metodologia de testes para adultos, com folhas tratadas. Repetições: 3. Delineamento: inteiramente casualizado ($\alpha = 0,05$).

O tratamento foi aplicado nas plantas até o ponto de escoamento, utilizando-se um pulverizador manual que precisava a dosagem aplicada, simulando as condições práticas de campo. Desvios na dosagem aplicada eram inferiores a 10%. Foram testadas as mais altas concentrações agronômicas.

Após a pulverização, as plantas foram deixadas por 3 h numa área ventilada, para a secagem da calda aplicada. Foram cortados os ápices de todas as plantas, eliminando as brotações e gemas apicais, para evitar a emissão de novas folhas.

Testes de exposição (contato) foram conduzidos aos 3, 10, 17, 24 e 31 dias após o tratamento das videiras. Folhas com resíduo foram coletadas de diversas partes das plantas, e espalhadas na superfície inferior das gaiolas de contato, a razão de 2 a 3 folhas/gaiola. Estas gaiolas de contato são as mesmas descritas nos testes com os adultos, porém sem terem sido pulverizadas (3.1.1.5).

Adultos de *Trichogramma* foram introduzidos nas gaiolas através dos tubos de emergência (Apêndice 3), como explicado na descrição dos testes dos adultos (3.1.1.9). As gaiolas ficaram nas mesmas condições experimentais descritas (3.1.1.16).

Os efeitos no parasitismo foram avaliados do mesmo modo como nos testes sobre adultos (3.1.1.10; 3.1.1.11; 3.1.1.12; 3.1.1.13). O número de ovos parasitados foi contado para cada parcela. Para cada produto em teste calculou-se a média na redução do parasitismo por fêmea em relação a testemunha.

O ensaio (tratamento) foi encerrado quando a redução na capacidade benéfica, em relação a testemunha era inferior a 30%.

3.1.4 Toxicidade em larvas

Estes testes foram conduzidos à semelhança do teste de toxicidade às pupas inseridas no interior de ovos do hospedeiro (3.1.2), empregando-se larvas de segundo ínstar. Ver tratamentos no item 3.4.

3.1.5 Toxicidade em ovos

Foram conduzidos à semelhança do teste de toxicidade com pupas inseridas dentro do ovo hospedeiro (3.1.2), empregando-se ovos. Os tratamentos encontram-se no item 3.4.

3.2 Experimentos com *Chrysoperla carnea*

A seguir estão descritos os procedimentos para os experimentos com larvas de primeiro ínstar (o mais vulnerável estágio de vida) de *C. carnea* (testes A e B). As metodologias experimentais laboratoriais para o estágio de vida menos vulnerável (pupa ou ovo) e persistência/semi-campo encontram-se, ainda, em desenvolvimento pelo Grupo de Trabalho da IOBC.

3.2.1 Criação de *C. carnea*

Os adultos foram mantidos em uma gaiola, constituída de um tubo cilíndrico de acrílico transparente (diâmetro = 15 cm, altura = 20 cm), coberto com tecido de algodão (gaze de farmacêutico) branco, e com uma placa de Petri revestida com papel filtro ao fundo. Os insetos foram alimentados com dieta artificial (15 ml de leite condensado, 1 ovo inteiro, 1 gema de ovo, 30 g de mel, 20 g de frutose, 30 g de levedura de cerveja, 30 g de germe de trigo e água destilada, misturados até formar uma pasta), aplicada em uma superfície de papel e renovada 3 vezes por semana; em paralelo oferecia-se água destilada embebida em chumaços de algodão.

A quase totalidade dos ovos era depositada no tecido de algodão. Eles foram coletados três vezes por semana, evitando a eclosão de larvas no interior das gaiolas de adultos e o canibalismo. Os ovos foram levados para incubação em caixas plásticas (15 x 10 x 8 cm) e tampadas até a eclosão das larvas.

As larvas recém-eclodidas foram transferidas para caixas plásticas maiores (30 x 25 x 10 cm) e alimentadas com ovos esterilizados de *Sitotroga cerealella* (três vezes por semana).

Ao final do período larval, as pupas eram coletadas e colocadas em gaiolas feitas com armação de madeira e teladas. Obtidos os adultos, estes eram transferidos para os tubos cilíndricos de acrílico (gaiolas de adultos) para acasalamento e obtenção de ovos.

Adultos e larvas foram mantidos em laboratório (23 ± 2 °C; $70 \pm 15\%$ UR; fotofase de 16 h, 2000 Lux, com lâmpadas luz do dia). Os ovos eram mantidos em geladeira (5 ± 2 °C) por até 3 semanas e, transferidos para as condições do laboratório para eclosão das larvas quando necessário.

3.2.2. Delineamento e unidade de teste

Uma unidade de teste (Figura 4 e Apêndice 9) consistiu de uma placa de vidro de 58 x 48 x 0,5 cm, com o pesticida aplicado na superfície. Após o pesticida secar por 2 a 3 horas, a placa de vidro era coberta com uma outra placa de acrílico, com as mesmas dimensões e dotada de 30 orifícios. Cada unidade teste tratamento consistia de um tratamento, e tinha 30 larvas de primeiro ínstar individualizadas, uma em cada orifício (Apêndice 10).

Cada orifício circular desta placa de acrílico tinha 7,5 cm de diâmetro. Anéis de plástico (1,5 cm de altura) e tratados com Fluon (GP 1) foram colocados nos orifícios. O conjunto orifícios + anéis de plástico delimitava a arena (7,2 cm) onde o inseto era submetido ao pesticida em teste. Estes anéis serviam de barreira para evitar a fuga da larva do crisopídeo em teste.

Os anéis estavam firmemente aderidos aos orifícios, para prevenir injúria nos insetos caso ocorresse movimento do anel plástico. A altura dos anéis permitia adequada ventilação na arena (Apêndice 10).

VISTA POR A

Figura 4 - Representação da unidade de teste para os experimentos com *C. carnea* (dimensões em milímetros)

3.2.3 Preparo e contato dos insetos-teste

Após a eclosão das larvas, estas foram alimentadas durante 48 horas com ovos frescos de *S. cerealella*. Uma larva, com dois dias de idade, foi infestada cuidadosamente em cada orifício (Apêndice 12), entrando em contato com a superfície da placa de vidro tratada (exposição). O efeito de uma substância era medido em 30 larvas por tratamento.

As condições do teste foram as mesmas da criação do inseto (23 ± 2 °C; $70 \pm 15\%$ UR; fotofase de 16 h, 2.000 Lux).

Cada experimento podia ter um ou mais pesticidas a serem testados. O tratamento testemunha negativa (água de torneira) também continha 30 larvas.

3.2.4 Aplicação dos tratamentos

A utilização dos pesticidas em teste, da testemunha positiva com as medidas de segurança foram descritas nos itens 3.1.1.1, 3.1.1.2 e 3.1.1.3.

As placas de vidro foram pulverizadas, em um dos lados, com o pesticida nas dosagens em teste. A mais alta dosagem agrônômica sempre foi incluída. O equipamento de pulverização utilizado pertencia a IBACON (Roßdorf, Alemanha), e consistia de uma mesa móvel de pulverização com bicos 8002E, pressão constante a 2,7 bar, velocidade dos bicos de 2 km/h e posicionados a 51 cm de altura do alvo.

O depósito era uniforme e consistia de $2 \pm 0,2$ mg de calda aplicada / cm² da placa de vidro. Após a secagem do calda (2 a 3 horas), a placa acrílica com os anéis plásticos eram colocados sobre a placa de vidro, fixadas firmemente por presilhas, e a infestação era realizada (3.2.5).

Os tratamentos dos experimentos em rede com *C. carnea* foram:

1. Testemunha negativaágua de torneira
2. Sumicidin Alpha 50 EC60 ml/ha
3. Sumicidin Alpha 50 EC.....100 ml/ha
4. Perfekthion 400 EC (testemunha positiva).....40 ml/ha

3.2.5 Infestação e contato dos insetos no pesticida em teste

Apenas uma larva, com dois dias de idade, era colocada em uma arena formada pelos anéis de plástico (Apêndice 10); eram alimentadas 3 vezes por semana com ovos esterilizados de *S. cerealella* até a pupação (Apêndice 12). É importante o procedimento de esterilização de ovos de *Sitotroga* com lâmpadas ultravioleta (40 minutos), pois caso contrário larvas da traça podem perfurar as pupas que se formavam. Os ovos de *Sitotroga* podiam ser conservados a 4 °C por 14 dias. Outro aspecto, diz respeito a limpeza da arena feita a cada 5 dias, para a retirada por sucção a vácuo dos detritos e alimento velho e não utilizado, sem no entanto tocar a superfície de vidro, evitando alterar o depósito do pesticida.

3.2.6 Avaliação

As pupas obtidas foram transferidas para recipientes plásticos (1,5 x 1,5 x 1,5 cm) tampados, individualizadas, mantidas nas mesmas condições do teste, até a obtenção dos adultos. Imediatamente após a emergência, os adultos foram sexados e transferidos para as gaiolas acrílicas cilíndricas (diâmetro = 15 cm, altura = 20 cm).

Todos os adultos emergentes do tratamento, provenientes das larvas que haviam sido expostas, foram então mantidos em gaiolas (Apêndice 13), sem serem expostos novamente no pesticida em teste, permitindo a mensuração da sua fertilidade e fecundidade. O topo destas gaiolas foram cobertos com tecido branco de algodão, para permitir a oviposição pelos adultos sobreviventes. Forneceu-se água em chumaços de algodão e dieta artificial para os adultos, como descrito no item 3.2.1. As gaiolas somente eram montadas para um mínimo de 5 casais ou um máximo de 15.

A contagem dos ovos começava 5-9 dias após a emergência dos adultos e seguia por 4 semanas. Fêmeas de *C. carnea* ovipositam 70-75% dos seus ovos neste período. O tecido branco de algodão era substituído 3 vezes por semana, para prevenir a destruição por canibalismo das possíveis larvas eclodidas. Os ovos obtidos no período foram contados. Amostragens foram feitas, contando-se o número de ovos depositados pelos adultos em 24 horas, na razão de duas contagens por semana durante as quatro semanas.

No começo do período de observação, a viabilidade de 200 ovos foi calculada. Se existia significativa diferença com a testemunha, a viabilidade era medida semanalmente.

Em suma, nas avaliações obteve-se: mortalidade larval e pupal, número de machos e fêmeas obtidos, oviposição e viabilidade de ovos, calculando-se a fertilidade e fecundidade.

A média na produção de ovos por fêmea foi calculada considerando a mortalidade de fêmeas durante os intervalos de observação. A média na produção de ovos por fêmeas oriundas de larvas tratadas foi comparada com aquelas da testemunha. O quociente [R] de tratadas e não tratadas deu a medida de quanto a fecundidade foi afetada pela exposição das forma jovem aos pesticidas.

A duração do período larval e pupal era também observada.

Nos dois testes, para o cálculo do efeito total (E) foi usada a seguinte fórmula de Overmeer & Zon, modificada por Vogt (1992):

$$E = 100\% - (100\% - M) \times R1 \times R2, \text{ onde:}$$

através das mortalidades larvais que eram anotadas diariamente, a mortalidade acumulada total foi obtida no final. Após a emergência do último adulto, a mortalidade pupal era medida e agregada ao total das larvas mortas. A mortalidade de larvas, pupas e pré-imagos, corrigida pela testemunha, fornecia a mortalidade pré-imaginal (M) do tratamento.

R1 é obtida pelo quociente entre: a média do número de ovos por fêmea por dia no tratamento dividida pela média do número de ovos por fêmea por dia na testemunha. R2 é obtido pelo quociente entre: a fertilidade média de ovos no tratamento dividida pela fertilidade média de ovos na testemunha.

3.3 Classes da IOBC e análise estatística

Para classificar os pesticidas quanto ao impacto sobre as espécies estudadas, aos resultados foram aplicadas a seguintes Classes da IOBC:

a) experimentos com adultos e pupas de *T. cacoeciae* e larvas de *C. carnea*

Classe 1	=	inócuo	=	< 30%
Classe 2	=	levemente nocivo	=	30 - 79%
Classe 3	=	moderadamente nocivo	=	80 - 99%
Classe 4	=	nocivo	=	> 99%

b) experimentos de persistência (*T. cacoeciae*) - laboratório ampliado

Classe 1	=	vida curta	=	< 5 dias
Classe 2	=	levemente persistente	=	5 - 15 dias
Classe 3	=	moderadamente persistente	=	16 - 30 dias
Classe 4	=	persistente	=	> 30 dias

A análise estatística foi aplicada de acordo com Finney (1964) e Soares et al. (1991), utilizando-se o programa de computador *SPSS for Windows* versão 6.0.

Nos experimentos de toxicidade em adultos (3.1.1), pupas (3.1.2), larvas (3.1.4) e ovos (3.1.5) de *T. cacoeciae*, as médias do número de ovos por fêmea foram comparadas pelo “teste t” de Student ($\alpha = 0,05$).

Foram feitos estudos de distribuição de frequência para o número de ovos por fêmea e adultos por gaiola (população inicial) encontrados nas parcelas do tratamento testemunha, com determinação das médias.

Com *C. carnea*, o “teste X^2 ” foi efetuado para avaliar a relação entre sobrevivência e mortalidade dos insetos submetidos aos tratamentos ($\alpha = 0,05$).

3.4 Ingredientes ativos dos pesticidas

Foram testados os seguintes pesticidas e seus respectivos ingredientes ativos:

a) experimentos com *T. cacoeciae*:

adultos: Aliette (fosetyl-Al), Afugan (pyrazophos) e Neem Azal (azadirachtin);

pupas: Aliette (fosetyl-Al);

larvas: Tamaron (methamidophos);

ovos: Aliette (fosetyl-Al) e Neem Azal (azadirachtin);

persistência: Dithane (mancozeb), Euparen M (tolylfluanid), Kumulus (sulfur), Polo (difenthiuron), Scala (pyrimethanil), Telmion (*rape seed oil* - óleo de semente de colza), Thiram (thiram), Touchdown (sulfosate), Vertimec (abamectin) e Zolone (phosalone).

b) experimentos com larvas de *C. carnea*:

Sumicidin (esfenvalerate), Perfekthion (dimetoathe).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O treinamento na utilização, aprimoramento dos métodos experimentais, criação, manutenção e controle de qualidade dos insetos produzidos foram as atividades conduzidas.

4.1 Experimentos com *T. cacoeciae*

A aplicação em sequência dos dois métodos experimentais de laboratório (adultos e pupas) e um de laboratório-ampliado (persistência), permitiu conferir classes da IOBC (1 a 4) aos pesticidas testados.

4.1.1 Toxicidade em adultos, pupas, larvas e ovos

Os resultados com o estágio de vida mais vulnerável de *T. cacoeciae* (adultos) encontram-se nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, e estão resumidos para os pesticidas Aliette e Afugan na Tabela 9. Enquanto que na Tabela 10 estão os resultados do experimento 11, feito sobre pupas, o estágio de vida menos vulnerável da espécie.

Os experimentos com ovos e larvas (Tabelas 11 e 12, respectivamente) foram complementares ao estudo. Esses tipos de experimentos assumiriam importância fundamental quando desenvolvidas pesquisas com produtos reguladores de crescimento (IGR) e microorganismos, por exemplo, já que estes produtos poderiam ter atuação maior naquelas fases.

A porcentagem de redução na capacidade de parasitismo das fêmeas, em relação a testemunha, determinou a classificação dos pesticidas, de acordo com a padronização da IOBC:

Classe 1	=	inócuo	=	< 30%
Classe 2	=	levemente nocivo	=	30 - 79%
Classe 3	=	moderadamente nocivo	=	80 - 99%
Classe 4	=	nocivo	=	> 99%

Tabela 1 - Experimento 1 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento*	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (1,375%)	4359	1502	2,90 a	91,6	3
Testemunha (Água)	53595	1553	34,51 b	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste "t" de Student, onde:

$t_{calc} = 26,27$; Prob > t = 0,00003

* 2 mg/cm²

Tabela 2 - Experimento 2 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (1,375%)	32787	1224	26,79 a	38,3	2
Testemunha (Água)	47633	1097	43,42 b	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

$$t_{\text{calc}} = 3,87 ; \text{Prob} > t = 0,00859$$

Tabela 3 - Experimento 3 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (1,375%)	35167	1835	19,16 a	30,3	2
Afugan 300 (0,4%)	5	1950	0,03 b	~100,0	4
Testemunha (Água)	48434	1761	27,50 c	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

Contraste 1 = Aliette x Afugan ($t_{\text{calc}} = 5,63$; $\text{Prob} > t = 0,00055$)

Contraste 2 = Aliette x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 2,49$; $\text{Prob} > t = 0,03307$)

Contraste 3 = Afugan x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 8,12$; $\text{Prob} > t = 0,00009$)

Tabela 4 - Experimento 4 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (0,75%)	28379	1494	18,99 a	31,2	2
Afugan 300 (0,4%)	19	1405	0,01 b	~100,0	4
Testemunha (Água)	41686	1509	27,62 c	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

Contraste 1 = Aliette x Afugan ($t_{\text{calc}} = 7,36$; Prob > t = 0,00014)

Contraste 2 = Aliette x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 4,92$; Prob > t = 0,00112)

Contraste 3 = Afugan x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 12,28$; Prob > t = 0,00002)

Tabela 5 - Experimento 5 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (0,75%)	30558	1291	23,67 a	25,3	1
Afugan 300 (0,4%)	34	1396	0,02 b	~100,0	4
Testemunha (Água)	35187	1110	31,70 c	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

Contraste 1 = Aliette x Afugan ($t_{\text{calc}} = 9,71$; Prob > t = 0,00004)

Contraste 2 = Aliette x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 3,29$; Prob > t = 0,00925)

Contraste 3 = Afugan x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 13,00$; Prob > t = 0,00001)

Tabela 6 - Experimento 6 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (1,375%)	8397	1282	6,55 a	71,1	2
Afugan 300 (0,4%)	0	1094	0 b	100,0	4
Testemunha (Água)	30015	1324	22,67 c	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

Contraste 1 = Aliette x Afugan ($t_{\text{calc}} = 3,18$; Prob > t = 0,01102)

Contraste 2 = Aliette x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 7,82$; Prob > t = 0,00011)

Contraste 3 = Afugan x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 11,00$; Prob > t = 0,00003)

Tabela 7 - Experimento 7 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Neem Azal - T/S (0,5%)	18944	1044	18,15 a	45,9	2
Testemunha (Água)	37723	1124	33,56 a	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

$t_{\text{calc}} = 2,304$; Prob > t = 0,05942

Tabela 8 - Experimento 8 (adultos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Neem Azal - T/S (0,5%)	14578	1222	11,93 a	57,0	2
Testemunha (Água)	40626	1464	27,75 b	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

$t_{calc} = 3,080$; Prob > t = 0,02135

Tabela 9 - Resultados de seis experimentos (adultos de *T. cacoeciae*). Porcentagem de redução na capacidade de parasitismo das fêmeas (%R) e classe da IOBC; ovos por fêmea e média da população inicial nas testemunhas negativas.

Experi- mento	Aliette 800 1,375%		Aliette 800 0,75%		Afugan 300 0,4%		Testemunha	
	%R	Classe	%R	Classe	%R	Classe	ovos/fêmea	população inicial/gaiola
1 ^a	91,6	3	-	-	-	-	34,51	388
2 ^b	38,3	2	-	-	-	-	43,42	274
3 ^b	30,3	2	-	-	~100,0	4	27,50	440
4 ^b	-	-	31,2	2	~100,0	4	27,62	377
5 ^b	-	-	25,3	1	~100,0	4	31,70	278
6 ^b	71,1	2	-	-	100,0	4	22,67	331

^a depósito da calda pesticida: 2 mg/cm² ± 10%

^b depósito da calda pesticida: 1,5 mg/cm² ± 10%

Tabela 10 - Experimento 11 (pupas de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução) e classe da IOBC.

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução	classe
Aliette 800 (1,375%)	53856	1440	37,40 a	0,0	1
Testemunha (Água)	43013	1236	34,80 a	-	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

$t_{\text{calc}} = 0,71$; Prob > t = 0,50848

Tabela 11 - Experimento 9 (ovos de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução).

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução
Aliette 800 (1,375%)	53412	1949	27,40 a	0,0
Neem Azal - T/S (0,5%)	37647	1568	24,01a	<1
Testemunha (Água)	35023	1416	24,73 a	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

Contraste 1 = Aliette x Neem Azal T/S ($t_{\text{calc}} = 0,61$; Prob > t = 0,55954)

Contraste 2 = Aliette x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 0,48$; Prob > t = 0,64388)

Contraste 3 = Neem Azal T/S x Testemunha ($t_{\text{calc}} = 0,13$; Prob > t = 0,89386)

Tabela 12 - Experimento 10 (larvas de *T. cacoeciae*): número de ovos parasitados (ovos pretos), população inicial (adultos / 4 gaiolas), média do número de ovos parasitados por fêmea de *T. cacoeciae* (ovos / fêmea), redução percentual na capacidade de parasitismo em relação a testemunha (% redução).

tratamento	ovos pretos	adultos / 4 gaiolas	ovos / fêmea	% redução
Tamaron 600 (0,15%)	0	0	0 a	100,0
Testemunha (Água)	50017	1374	36,40 b	-

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste " t " de Student, onde:

$t_{calc} = 16,07$; Prob > t = 0,00007

Na Tabela 1 encontram-se os resultados do experimento 1, onde o fungicida Aliette (1,375%) obteve Classe 3, em função de promover uma redução de 91,3% no número de ovos por fêmea. A aplicação do teste *t* mostrou que essa diferença foi estatisticamente significativa em relação a testemunha.

Entretanto, nos experimentos 2, 3 e 6 (Tabelas 2, 3 e 6), o Aliette (1,375%) foi classificado como 2, pelo critério da IOBC, com reduções de 38,3%, 30,3% e 71,1% na capacidade benéfica, medida como número de ovos por fêmea; com diferenças estatísticas pelo teste *t* de Student em relação às testemunhas positiva e negativa.

Essa diferença na classificação do Aliette (1,375%) foi decorrência da diferença no depósito aplicado do pesticida. No experimento 1 foi aplicado $2 \text{ mg/cm}^2 \pm 10\%$ de calda durante a pulverização, enquanto que nos experimentos 2, 3 e 6 os tratamentos foram aplicados a $1,5 \text{ mg/cm}^2 \pm 10\%$. A segunda coluna da Tabela 9 mostra a sumarização destas diferenças, decorrentes de uma maior toxicidade quando aplicadas dosagens maiores do Aliette (1,375%) por cm^2 de placa de vidro.

Os resultados semelhantes, alcançados pelo Aliette mostraram que a metodologia utilizada indicou uma boa reprodutibilidade dos resultados, evidenciando a precisão do método quando os testes são conduzidos em condições padronizadas.

Convém lembrar que a inocuidade de um produto (Classe 1) pode ser facilmente demonstrada em experimentação de laboratório, entretanto sua toxicidade (Classe 4) somente poderia ser confirmada sob condições de campo.

Como a metodologia padrão combina dois métodos experimentais de laboratório e um em condições de laboratório-ampliado, em seqüência, a conclusão final deverá ser obtida nos passos seguintes, que são os testes de pulverização direta de pupas dentro do ovo do hospedeiro e o teste de persistência em folhas.

Quando o Aliette (1,375%) foi aplicado em pulverização direta de pupas, dentro do ovo hospedeiro, foi obtida classe 1, não havendo redução na capacidade de parasitismo de fêmeas. Fato confirmado pela aplicação do teste *t* de Student, onde não ocorreram diferenças estatísticas com a testemunha negativa.

Aliette a 0,75% mostrou ser menos tóxico que na concentração de 1,375%. Foi classificado como Classe 2 (Tabela 4) e Classe 1 no experimento 5 (Tabela 5), com 31,2% e 25,3% de redução no número de ovos por fêmea respectivamente. Assim, Aliette 0,75% decididamente foi classificado como inócuo ou levemente nocivo, com reduções na capacidade benéfica muito próximas a 30%, que é o limiar entre as classes 1 e 2, classes que de qualquer forma não demandariam a condução dos testes seqüenciais. Nesse caso ficou evidente que os resultados obtidos com Aliette 0,75% do experimento 4 ficaram semelhantes aos do experimento 5, em termos de redução da capacidade de parasitismo, confirmando a estabilidade dos resultados.

A testemunha positiva, Afugan a 0,4%, foi Classe 4 em todos os experimentos de toxicidade a adultos (resultados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6, resumidos na Tabela 9), sempre reduzindo mais de 99% a oviposição das fêmeas de *T. cacoeciae* tratadas, evidenciando que o método experimental mostra estabilidade de resultados, quando conduzidos nas condições padronizadas.

Igualmente, nos experimentos 7 e 8 (Tabelas 7 e 8) foi avaliada a toxicidade de Neem Azal (0,5%) sobre adultos do parasitóide, e em ambos os casos o pesticida teve Classe 2. Inclusive no experimento 7 não ocorreu diferença estatística significativa pelo teste *t* entre o Neem Azal e a testemunha negativa (água de torneira).

Dessa forma, este pesticida foi considerado levemente nocivo a *T. cacoeciae*, não sendo necessária a condução dos testes sobre pupas e persistência.

Nos experimentos (9 e 10) com exposição de ovos e larvas (Tabelas 11 e 12, respectivamente) a pesticidas, verificou-se que Aliette (1,375%) e Neem Azal (0,5%) foram inócuos quando pulverizados sobre ovos do parasitóide inseridos no hospedeiro, não havendo diferenças estatisticamente significativas dos pesticidas com a testemunha negativa pelo teste *t*, enquanto que o inseticida Tamaron (0,15%) provocou a mortalidade de 100% das larvas de *Trichogramma*, quando estas encontravam-se inseridas dentro do ovo do hospedeiro, sendo significativamente diferente da testemunha negativa (água de torneira) pelo mesmo teste *t*.

4.1.2 Persistência em adultos (laboratório-ampliado)

Os resultados do teste de persistência encontram-se na Tabela 13, e estão expressos graficamente na Figura 5.

Tabela 13 - Experimento de persistência: redução na capacidade de parasitismo de *T. cacoeciae* (%), em relação a testemunha, nos diversos tratamentos. DAA = dias após a pulverização.

tratamentos	concentração	DAA				
		3	10	17	24	31
ZOLONE FLOW 500	0,24%	98	95	93	87	97
TELMION 85	4,00%	52	10	3	9	0
VERTIMEC 18	0,375%	86	10	0	9	0
POLO 250 SC	0,10%	100	100	100	94	96
THIRAM 80 WG	0,80%	77	55	43	46	47
EUPAREN M 500 WG	0,625%	99	99	88	100	96
DITHANE M 45 WP	0,90%	88	94	99	89	95
KUMULUS DF	2,00%	100	100	100	100	99
SCALA 40 SC	0,50%	67	41	4	5	6
TESTEMUNHA	(Água)	-	-	-	-	-

Figura 5 - Experimento de persistência: representação gráfica da porcentagem de redução na capacidade de parasitismo de *T. cacoeciae*, em relação a testemunha, nos diversos tratamentos. Exposição de adultos em folhas de videira pulverizadas, a intervalos variáveis de tempo (dias após a pulverização).

No teste de persistência, a redução na capacidade de parasitismo foi calculada por tratamento, em relação a testemunha negativa (água de torneira), nos seguintes intervalos de tempo após a aplicação: 3, 10, 17, 24 e 31 dias. A duração da atividade tóxica foi o tempo requerido para o resíduo do pesticida perder a efetividade, assim que a redução no parasitismo, em relação a testemunha, fosse inferior a 30%. Até recentemente a IOBC considerava o limite de 50% para determinar o final da persistência de um produto, hoje este limite é mais rígido (30%).

Aos resultados foram aplicadas as classes definidas pela IOBC:

Classe 1	=	vida curta	=	< 5 dias
Classe 2	=	levemente persistente	=	5 - 15 dias
Classe 3	=	moderadamente persistente	=	16 - 30 dias
Classe 4	=	persistente	=	> 30 dias

Basicamente, os pesticidas testados tiveram comportamentos que permitiram serem divididos em três grupos (Figura 5).

O primeiro grupo, englobando Kumulus, Polo, Zolone e Dithane, caracterizou-se por conter pesticidas persistentes ao longo de todo o experimento, todos classificados como Classe 4.

Kumulus causou 100% de redução na capacidade benéfica de fêmeas de *T. cacoeciae* até 24 dias após a aplicação (daa); na avaliação realizada 31 dias após as plantas de videira terem sido tratadas, este produto manteve o elevado efeito deletério (99%) na oviposição das fêmeas.

Polo causou 100% de redução na capacidade benéfica do parasitóide até os 17 daa, e nas avaliações realizadas aos 24 e 31 daa as reduções foram 94% e 96% respectivamente.

O pesticida Zolone também caracterizou-se por ser persistente ao *Trichogramma* ao longo de todo o experimento, com reduções na capacidade benéfica das fêmeas de 98%, 95%, 93%, 87% e 97% nas avaliações realizadas aos 3, 10, 17, 24 e 31 daa.

Dithane foi outro pesticida que mostrou ter longa persistência em plantas. Neste teste de laboratório-ampliado, Dithane reduziu a oviposição das fêmeas de *T. cacoeciae*, em relação a testemunha (água de torneira), em 88%, 94%, 99%, 89% e 95% aos 3, 10, 17, 24 e 31 daa respectivamente.

A determinação do TL_{30} (período de tempo, em dias, necessário para o pesticida reduzir em 30% a capacidade benéfica de *T. cacoeciae*) destes pesticidas seria possível de ser obtida apenas com a continuidade do teste por um período de tempo superior ao preconizado pela metodologia padrão da IOBC, entretanto é possível verificar graficamente (Figura 5) que este valor certamente ficaria acima dos 31 dias, portanto os pesticidas seriam mesmo Classe 4, não justificando a continuidade do experimento

No segundo grupo encontram-se os pesticidas Vertimec, Scala e Telmion, que caracterizaram-se por serem levemente persistentes (Classe 2).

Aos resultados obtidos com estes pesticidas foi usado o método de próbite, para estimativa do TL_{30} . Entretanto, o modelo aplicado mostrou-se inadequado para oferecer com precisão os TL_{30} dos pesticidas, pois os valores de X^2 (g.l. = 3) foram significativos (X^2 para o tratamento com Vertimec = 46820; X^2 Scala = 10975; X^2 Telmion = 12936).

Devido a inadequação para o modelo de próbite ao caso, foi feita uma estimativa gráfica dos TL_{30} para os pesticidas Vertimec, Scala, Telmion e Thiram, baseando-se nas respectivas curvas localizadas na Figura 5.

Esta impossibilidade de aplicação de próbite parece estar associada a uma falha na padronização das datas das avaliações preconizadas atualmente pela IOBC. Sugere-se que as avaliações da redução na capacidade benéfica, nesta modalidade de teste de laboratório-ampliado (persistência), obedeçam uma progressão logarítmica do tempo de avaliação, por exemplo avaliando-se aos 1, 3, 6, 10, 18 e 32 dias após a aplicação. Com esta sugestão o modelo de próbite poderia se ajustar melhor.

Na análise da redução na capacidade benéfica de *T. cacoeciae* feita por Vertimec, percebeu-se que este pesticida reduziu-a em 86% aos 3 daa. Já nas avaliações seguintes ocorreu uma acentuada redução na persistência do Vertimec. O TL_{30} estimado

graficamente para o Vertimec foi cerca de 8 dias, resultado que permitiu classificá-lo como um pesticida Classe 2, de acordo com o critério da IOBC, ou seja levemente persistente.

Scala também foi Classe 2. Esta classificação decorreu dos resultados obtidos, onde este pesticida reduziu a capacidade benéfica do parasitóide em 67% e 41% aos 3 e 10 daa, respectivamente; nas avaliações subsequentes as reduções ficaram inferiores ou iguais a 6%. O TL_{30} estimado do Scala foi aproximadamente 12 dias, classificando-o como levemente persistente.

Ainda como Classe 2 encontrou-se o Telmion, cuja redução no número de ovos por fêmea foi de 52% aos 3 daa e com valores iguais ou inferiores a 10% nas avaliações feitas aos 10, 17, 24 e 31 daa. O TL_{30} estimado deste produto foi de aproximadamente 5 dias, classificando-o como um produto levemente persistente.

Observações feitas indicaram que a toxicidade do Telmion a *T. cacoeciae* foi, principalmente, em função de uma ação mecânica do produto. O adultos ficavam aderidos às folhas das plantas, imobilizados, com posterior morte, graças a adesão que este óleo vegetal revelava. Este fato foi muito evidente na avaliação feita aos 3 daa.

O terceiro grupo foi representado pelo Thiram, que ocupou uma posição intermediária entre o primeiro e o segundo grupo. Mas, de acordo com a classificação da IOBC, Thiram foi Classe 4, persistente, como o primeiro grupo. Entretanto, ficou evidenciado seu comportamento de menor risco que os pesticidas do primeiro grupo. Aos 3 daa, Thiram teve capacidade de reduzir em 77% a capacidade benéfica do parasitóide, já nas avaliações feitas posteriormente até 31 daa, essa redução variou entre 55% e 43%, mostrando que este pesticida sugeria ter um menor impacto que os produtos do primeiro grupo, mas a palavra final seria obtida quando fosse submetido ao teste de campo para classificá-lo definitivamente.

Esta divisão dos resultados, separando os pesticidas em três grupos, abre espaço para uma discussão sobre o posicionamento dos produtos para programas de manejo integrado.

O caso do Thiram ilustra bem a situação de um pesticida que apesar de ser Classe 4 pela metodologia atual da IOBC, como os do primeiro grupo (Kumulus, Polo,

Zolone e Dithane), teria menor risco em programas de manejo com liberações inundativas de *T. cacoeciae*, por exemplo. Sua persistência longa, porém reduzindo em 50% a capacidade benéfica, é de menor impacto que a persistência longa promovida pelos pesticidas do primeiro grupo (próxima ou superior a 90%).

Para o segundo grupo (Vertimec, Scala e Telmion) o impacto seria o menor dentre os produtos testados neste trabalho. Poderia, ainda, existir um possível quarto grupo, que neste trabalho não teve nenhum representante, com produtos sem nenhum impacto sobre a espécie, e que seriam aqueles Classe 1 da metodologia atual da IOBC.

Os produtos herbicidas, como Touchdown (Tabela 14), são impossíveis de serem testados num experimento de laboratório-ampliado (persistência), uma vez que a ação herbicida do produto mata as plantas, impossibilitando a coleta de dados experimentais. Assim, para estes casos, o passo seguinte seria testá-lo em condições de semi-campo e campo, obtendo as informações sobre o pesticida.

Tabela 14 - Toxicidade de diferentes pesticidas a *T. cacoeciae*. Resultados obtidos no teste a (adultos), no teste b (pupas) e teste de persistência (contato de adultos em folhas de videira tratadas, a intervalos variáveis de tempo). Porcentagem de redução (%R) na capacidade de parasitismo. Persistência do pesticida, em dias após a aplicação (DAA). Classe da IOBC nos diferentes tipos de teste (Classe).

Tratamento	teste a*			teste b*			persistência**	
	%R	Classe		%R	Classe		DAA	Classe
ZOLONE FLOW 500 0,24%	100	4		18,5	1		>30	4
TELMION 85 4,00%	100	4		48,0	2		~5	2
VERTIMEC 18 0,375%	100	4		96,0	3		~8	2
POLO 250 SC 0,10%	100	4		7,1	1		>30	4
THIRAM 80 WG 0,80%	100	4		35,7	2		>30	4
EUPAREN M 500 WG 0,625%	100	4		0,0	1		>30	4
DITHANE M 45 WP 0,90%	100	4		13,4	1		>30	4
KUMULUS DF 2,00%	100	4		64,3	2		>30	4
TOUCHDOWN 2,5%	99,6	4		5,4	1		*	*
SCALA 40 SC 0,50%	98	3		0,0	1		~12	2

* Testes 'a' e 'b', resultados extraídos do 8º JPTP do IOBC/WPRS, no prelo; aqui apresentados para ilustrar melhor a discussão

**1= vida curta (<5 dias); 2= levemente persistente (5-15 dias); 3= moderadamente persistente (16-30 dias); 4= persistente (>30 dias)

A análise deste experimento de persistência (laboratório-ampliado), em conjunto com as classificações alcançadas por estes mesmos pesticidas em experimentos de toxicidade a adultos e pupas (Tabela 14), sugere que os produtos Scala, Vertimec e Telmion seriam os preferidos para programas de manejo integrado, dentre os testados,

pois apesar de terem sido classificados como nocivos ou moderadamente nocivos aos adultos de *T. cacoeciae*, foram inócuos ou levemente nocivos às pupas e levemente persistentes, com vida variando entre 5 e 15 dias.

Tem sido muito útil essa interpretação conjunta dos resultados entre os três testes de laboratório (adultos, pupas e ampliado/persistência) para a mensuração do risco de produtos para programas de manejo integrado. A combinação dos resultados de laboratório permitirá no futuro uma nova classificação do potencial de risco de um pesticida, considerando agregadamente seu efeito tóxico e a duração desta atividade. Os testes de laboratório com o estágio de vida mais vulnerável de inseto teriam a finalidade de provar a ausência de toxicidade do pesticida, separando os inócuos dos pouco nocivos; os laboratoriais com o(s) estágios de vida menos vulnerável(eis) permitiriam diferenciação entre preparados com alguma toxicidade; já os de persistência ajudariam a estimar o risco, uma vez que o impacto do pesticida no campo é grandemente afetado pela sua persistência. Os experimentos de semi-campo e campo dariam informações relevantes do risco para a prática e classificando os realmente nocivos. Produtos com toxicidade, porém de vida curta, poderiam ser usados com sucesso em certos casos particulares de programas de manejo integrado.

Por exemplo, um pesticida que foi nocivo a adultos de *Trichogramma*, mas inócuo a pupas protegidas dentro do ovo e também teve baixa persistência no vegetal, faz com que este último fator assumam importância. Se os adultos emergissem de pupas tratadas mas morressem pelos resíduos do produto, o pesticida manter-se-ia nocivo; se, entretanto, os adultos emergentes não morressem pelos resíduos, por causa da baixa persistência do produto, o produto iria ter pouco impacto.

Esta concepção de interpretação conjunta dos testes assumirá importância muito grande para as decisões e o futuro do manejo integrado, oferecendo uma análise dirigida a prática.

4.1.3 Parâmetros experimentais padronizados

Como abordado anteriormente, e de acordo com a experiência do Grupo, muitos casos de insucesso experimental ocorriam da falta de padronização da população inicial, imprecisões na contagem do parasitismo, variabilidade, frequência e forma de oferta de ovos para parasitismo, luminosidade, ventilação e período mínimo de exposição (contato). Assim, foi necessário definir estes parâmetros, aprimorando-os, para tornar os experimentos ótimos em termos de fidedignidade e reprodutibilidade.

Como estes experimentos são exigidos pela legislação da União Européia para fins de registro, existia uma demanda muito grande por materiais biológicos para os testes. Uma primeira providência foi a divulgação dos avanços obtidos para entidades fornecedoras de materiais para os testes, evidenciando a preocupação com a qualidade e a padronização dos materiais biológicos para os experimentos. O *kit* para um tratamento com quatro repetições foi estabelecido:

- 4 círculos ($\varnothing$ igual a 10 mm), com 450 ± 100 ovos de *Sitotroga cerealella* cada. Os ovos foram aderidos em papel milimetrado e parasitados (população inicial de *T. cacoeciae*);
- 24 cartões de papel milimetrado com três círculos de ovos ($\varnothing$ igual a 15 mm cada). Cada círculo com 1.000 ± 200 ovos de *S. cerealella* aderidos;
- alimento para os adultos de *T. cacoeciae* (constituído de 3 g de gelatina mais 100 ml de água destilada em 200 g de mel Langnese, acondicionado em seringa de farmácia de 5 ml e conservado em geladeira a $4 \pm 2^\circ\text{C}$).

A implementação da utilização de papel milimetrado como material para os cartões de ovos, tanto da população inicial, como os cartões para avaliar os resultados, permitiu uma melhora efetiva na facilidade para a contagem dos ovos. Antes disso, era usado papel sulfite 40, branco, que dificultava a boa contagem dos ovos nos cartões com ovos.

Além disso, fazia-se necessário padronizar a população inicial por gaiola para reduzir a variação de resultados, especialmente no desempenho reprodutivo da espécie. Até então, eram muito variáveis também o número de indivíduos liberados por gaiola, por ocasião da instalação do experimento. Em determinados momentos tinha-se um número muito elevado de adultos, e nesse caso ocorria hiperparasitismo nos cartões, ou então os insetos liberados não tinham ovos hospedeiros para parasitar, prejudicando a boa mensuração dos resultados (expressos em número de ovos por fêmea de *T. cacoeciae*). Em outros casos a população inicial era muito baixa, dificultando a separação das diferenças entre tratamentos. As Tabelas 15, 16 e 17 (Figura 6, Figura 7 e Figura 8) mostram que a população inicial de *Trichogramma cacoeciae* por gaiola foi de 350 ± 50 adultos, onde nos experimentos considerados fidedignos, a média do número de adultos/gaiola nas testemunhas negativas foi de 341,73; com predominância entre 350 ± 25 .

Tabela 15 - Número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos.

experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	P3	P10	P17	P24	P31
adultos / gaiola	377	440	354	388	274	281	278	331	366	344	309	382	342	359	301

média: 341,73; desvio: 46,97; máximo: 440; mínimo: 274;

Figura 6 - Representação gráfica do número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos (média = 341,73; desvio padrão = 46,97).

Tabela 16 -.Frequência (observada) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos.

adultos / gaiola	200±25	250±25	300±25	350±25	400±25	450±25	500±25
frequência observada	9	23	30	81	35	23	10

Figura 7 -.Representação gráfica da frequência (observada) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos.

Tabela 17 - Frequência (relativa) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos.

adultos / gaiola	200±2	250±2	300±2	350±2	400±2	450±2	500±2
% de casos	5	5	5	5	5	5	5
	4	11	14	38	17	11	5

Figura 8 - Representação gráfica da frequência (relativa) de casos no número de adultos/gaiola (população inicial), em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos.

Para esta população inicial foi oferecido, distribuídos ao longo do experimento, cerca de 18.000 ovos de *S. cerealella* por gaiola para o parasitismo, como segue: no segundo dia (dia seguinte ao tratamento) três cartões de papel, contendo três círculos de ovos de *S. cerealella* por cartão (1000 ± 200 ovos em cada círculo). No terceiro dia foram oferecidos dois cartões de papel e no quinto apenas um cartão. Os cartões foram confeccionados com ovos frescos de *S. cerealella* aderidos.

Na Figura 10 encontram-se o número de ovos/fêmea em função do número de fêmeas por gaiola, em todas as testemunhas negativas (água de torneira) dos experimentos conduzidos. Verificou-se que com aumento do número de fêmeas/gaiola ocorria um decréscimo no número de ovos por fêmea. Um experimento cujo número de ovos/fêmea, na testemunha negativa, for inferior a 15, não tem validade. Esse limiar de 15 ovos/fêmea na testemunha negativa é o parâmetro importante para validar um experimento.

Nas testemunhas de todos os experimentos conduzidos, o número de casos de ovos/fêmea superiores a 15 foi $n = 79$, enquanto que foram obtidos $n = 12$ para valores inferiores. Para os casos superiores a 15 ovos/fêmea, a média do número de fêmeas por gaiola foi de $353,6 (\pm 10,7)$. Ver Figura 10.

Os cartões de papel com ovos hospedeiros foram colocados sempre na projeção da área iluminada das gaiolas. Os novos cartões foram colocadas sobre aqueles dos dias anteriores.

Outro parâmetro padronizado, com os testes, foi a luminosidade. Luz excessiva estressava os insetos, provocando sua morte precocemente. A luz tinha que ser difusa e contínua (24h) sobre as gaiolas, com 2500 Lux (3 primeiras horas) e 500 Lux (durante o teste). Do mesmo modo, a ventilação deveria ser controlada, minimizando o *stress* dos insetos: uma bomba de vácuo (1 l/min) deveria ser utilizada para 4 a 8 gaiolas, com o fluxo de ar uniformemente distribuído.

Salienta-se que a média do número de ovos por fêmea, obtidos na testemunha negativa, foi um dos mais importantes parâmetros para validar o experimento. Quando esta média fosse inferior a 15 ovos por fêmea de *T. cacoeciae*, o experimento era invalidado, por possuir algum erro experimental que o condenava. O número ideal de ovos por fêmea na testemunha negativa deveria ser próximo ou superior a 30. Neste trabalho, onde estão apresentados resultados médios de testemunhas negativas de 22 experimentos, as médias deste índice foram 31,8 ovos/fêmea (Tabela 18 e Figura 9).

Tabela 18 - Número de ovos por fêmea, em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos.

experi- mento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	P3	P10	P17	P24	P31
ovos / fêmea	28	28	25	35	43	34	28	23	35	37	36	28	29	37	32	34	39	35	30	31	21	31
média: 31,77; desvio: 5,35; máximo: 43; mínimo: 21

Figura 9 - Representação gráfica do número de ovos por fêmea, em tratamentos testemunha, obtidos em diversos experimentos (*T. cacoeciae*) conduzidos e considerados válidos (média = 31,77; desvio padrão = 5,35).

Figura 10 - Número de ovos/fêmea em relação ao número de fêmeas de *T. cacoeciae* por gaiola nas parcelas dos tratamentos testemunha negativa. Limiar = 15.

Outro aspecto de fundamental importância foi a padronização do período mínimo de contato dos insetos ao pesticida aplicado nas placas de vidro (experimentos de toxicidade a adultos). Após o tratamento das placas de vidro, esperou-se a secagem para a confecção das gaiolas. Então, um período de 6 horas foi aguardado antes que fossem oferecidos os primeiros ovos hospedeiros para parasitismo. Este foi considerado o período mínimo de contato dos insetos aos produtos.

O valor da interpretação conjunta dos resultados, através da combinação dos testes de laboratório, para uma avaliação final do risco foram discutidas no item 4.1.2.

4.2 Experimentos com *C. carnea*

Aos resultados foi aplicado o teste não-paramétrico de “ X^2 ”, para avaliar a relação entre sobrevivência *versus* mortalidade dos insetos submetidos aos tratamentos (Tabelas 19 e 22). Este teste estatístico indicou que as proporções de sobreviventes entre

os quatro tratamentos são significativamente diferentes ao nível de significância de 5%, nos dois testes (A e B) com *C. carnea*.

Os resultados do teste A (Tabela 19) corresponderam muito proximamente a outros resultados de outros laboratórios que estavam sendo conduzidos em rede. A performance dos insetos na testemunha negativa (água de torneira), no que diz respeito a fecundidade e fertilidade foi excelente (Tabela 20).

Na avaliação da mortalidade corrigida de *C. carnea* submetida aos pesticidas no teste A, com aplicação da fórmula de Abbott (1925), indicou que Sumicidin 60 ml/ha e Sumicidin 100 ml/ha promoveram mortalidade de 50% e 85% respectivamente, enquanto a testemunha positiva (Perfekthion) alcançou 100% (Tabela 19).

Entretanto, a mortalidade de larvas e pupas na testemunha negativa foi alta (Tabela 19). As quatro mortes de larvas de primeiro ínstar (L1), dos casos de mortalidade larval e pupal na testemunha negativa, ocorreram por mortalidade natural (1 caso) e provavelmente problemas de manipulação (3 casos); três L2 morreram (1 por mortalidade natural e 2 foram predadas por aranhas na sala climatizada); uma L3 teve mortalidade natural; e em duas pupas desta testemunha não houve emergência de adultos. Para o “Working Group ‘Pesticides and Beneficial Organisms’”, mortalidade superior a 10% na testemunha é um indicativo de problemas experimentais, e neste teste A ocorreram 5 casos de larvas mortas decorrentes a problemas de manipulação e predação por aranhas.

A variabilidade de resultados de certos sistemas de teste pode ser tão alta, gerando problemas na correta mensuração do risco, principalmente ao usarmos 30% como limiar para a inocuidade de um pesticida, levando a resultado falso positivo ou falso negativo. Basicamente, dois caminhos poderiam ser seguidos para minimizar estes problemas: 1) melhorar o método com o intuito de reduzir a variabilidade no sistema; caminho que está sendo feito pelos especialistas ligados aos experimentos em rede; 2) incorporação de reflexões estatísticas para a seleção de um sistema próprio, apropriando o número de repetições e permitindo a aferição dos dados obtidos.

O número de insetos (30 L1) usados no tratamento parece ser pequeno, e pequenos distúrbios e erros experimentais poderiam comprometer os resultados. Uma sugestão seria aumentar a quantidade de insetos em teste por pesticida.

No teste B (tabela 22) os efeitos dos tratamentos pesticidas se aproximaram muito dos obtidos por outros especialistas da rede. A fecundidade e fertilidade da testemunha negativa (água de torneira) foi muito boa (Tabela 23). Além disso a mortalidade larval e pupal nesta testemunha foi baixa, com melhor qualidade em relação ao teste A, decorrente de um maior controle experimental (Tabelas 19 e 22).

Na avaliação da mortalidade corrigida de *C. carnea* submetida aos pesticidas neste teste B, com aplicação da fórmula de Abbott (1925), indicou que Sumicidin 60 ml/ha e Sumicidin 100 ml/ha promoveram mortalidade de 50% e 100% respectivamente, e a testemunha positiva (Perfekthion) alcançou 100% (Tabela 22).

Os sobreviventes do tratamento Sumicidin 60 ml/ha não ovipositaram (Tabelas 21 e 24), enquanto que no tratamento Sumicidin 100 ml/ha não houveram sobreviventes. O fenômeno manifestado por Sumicidin 60 ml/ha, onde não ocorreu oviposição, foi muito interessante, entretanto não foi observado em todos experimentos em rede. Em alguns dos casos, adultos do tratamento Sumicidin 100 ml/ha ovipositaram, porém menos que a testemunha negativa e a viabilidade de seus ovos, em alguns casos foi afetada.

Como nos dois experimentos (Tabela 19 e 22) ocorreu mortalidade total (100%) com o tratamento Perfekthion, não foram obtidos adultos para permitir avaliar a fertilidade e a fecundidade. O mesmo que havia ocorrido com Sumicidin 100 ml/ha em ambos os testes.

Observações feitas neste trabalho indicam que a relação entre o número de machos e fêmeas por gaiola pode afetar a oviposição. Sugere-se estudar a capacidade de postura de *C. carnea* em função da razão sexual nas gaiolas. Também é conveniente otimizar o número máximo e mínimo de casais por gaiola para diminuir a variabilidade reprodutiva na espécie em estudo.

Tabela 19 - Mortalidade de *C. carnea* no Teste A. Primeiro ínstar (L1), larvas mortas (dados acumulados totais), período larval, pupas mortas, período pupal, sobreviventes (larvas + pupas) e mortalidades (%).

Tratamentos	população inicial (L1)	larvas mortas	período larval (dias)	pupas mortas	período pupal (dias)	sobreviventes (larvas + pupas)	mortalidade (%)	mortalidade corrigida (%)
Testemunha	30	8	11,0	2	10,3	20	33,3	-
Sumicidin 60	30	16	18,1*	4	11,2*	10	66,7	50,0
Sumicidin 100	30	23	19,4*	4	13,0*	3	90,0	85,0
Perfekthion	30	30	-	-	-	0	100,0	100,0

* duração do desenvolvimento superior a testemunha

$$X^2_{\text{calc}} = 39,57 > X^2_{0,05(3)} = 7,81$$

Tabela 20 - Resultados da reprodução de *C. carnea* na testemunha negativa (Teste A). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.

24 h de postura (período)*	fêmeas / gaiola	machos / gaiola	número de ovos	ovos viáveis	ovos inviáveis	larvas recém-eclodidas mortas	fertilidade (%)	fecundidade ovos / fêmea . dia
18/19-DEZ**	9	11	180	155	21	4	86	20
21/22-DEZ	9	11	237	206	29	2	87	26
26/27-DEZ	9	11	303	262	36	5	86	34
30/31-DEZ	9	11	290	254	33	3	87	32
02/03-JAN	9	11	341	293	43	5	85	38
06/07-JAN	9	10	217	169	45	3	77	24
10/11-JAN	9	10	326	298	25	3	91	36
13/14-JAN	9	10	272	228	43	1	83	30
MÉDIA	9	-	2166	-	-	-	85	30
FERTILIDADE DE OVOS	-	-	200	175	19	6	88	-

* 8:00 h

** 5-9 dias após a emergência

Tabela 21 - Resultados da reprodução de *C. carnea* no tratamento Sumicidin Alpha a 60 ml/ha (Teste A). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.

24 h de postura (período) *	fêmeas / gaiola **	machos / gaiola	número de ovos	ovos viáveis	ovos inviáveis	larvas recém- eclodidas mortas	fertilidade (%)	fecundidade ovos / fêmea . dia
18/19-DEZ	6	4	0	-	-	-	-	-
21/22-DEZ	6	4	0	-	-	-	-	-
26/27-DEZ	6	4	0	-	-	-	-	-
30/31-DEZ	6	4	0	-	-	-	-	-
02/03-JAN	6	4	0	-	-	-	-	-
06/07-JAN	6	4	0	-	-	-	-	-
10/11-JAN	6	4	0	-	-	-	-	-
13/14-JAN	6	4	0	-	-	-	-	-
MÉDIA	6	-	-	-	-	-	-	-
FERTILIDADE DE OVOS	-	-	-	-	-	-	-	-

* 8:00 h

** não ovipositaram

Tabela 22 - Mortalidade de *C. carnea* no Teste B. Primeiro ínstar (L1), larvas mortas (dados acumulados totais), período larval, pupas mortas, período pupal, sobreviventes (larvas + pupas) e mortalidades (%).

Tratamentos	população inicial (L1)	larvas mortas	período larval (dias)	pupas mortas	período pupal (dias)	sobreviventes (larvas + pupas)	mortalidade (%)	mortalidade corrigida (%)
Testemunha	30	2	12,1	0	10,0	28	6,7	-
Sumicidin 60	30	14	18,9*	2	11,5	14	53,3	50,0
Sumicidin 100	30	27	22,3*	3	-	0	100,0	100,0
Perfekthion	30	30	-	-	-	0	100,0	100,0

* duração do desenvolvimento superior a testemunha

$\chi^2_{\text{calc}} = 78,97 > \chi^2_{.05(3)} = 7,81$

Tabela 23 - Resultados da reprodução de *C. carnea* na testemunha negativa (Teste B). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.

24 h de postura (período)*	fêmeas / gaiola	machos / gaiola	número de ovos	ovos viáveis	ovos inviáveis	larvas recém-eclodidas mortas	fertilidade (%)	fecundidade ovos / fêmea . dia
01/02-MAR**	12	11	164	142	21	1	87	14
04/05-MAR	12	11	177	150	25	2	85	15
07/08-MAR	12	11	252	220	31	1	87	21
10/11-MAR	12	11	213	190	19	4	89	18
13/14-MAR	12	11	209	188	20	1	90	17
16/17-MAR	12	9	141	120	20	1	85	12
19/20-MAR	12	9	193	166	26	1	86	16
22/23-MAR	12	9	144	120	23	1	83	12
MÉDIA	12	-	1493	-	-	-	87	15,6
FERTILIDADE DE OVOS	-	-	200	178	18	4	89	-

* 8:00 h

** 5-9 dias após a emergência

Tabela 24 - Resultados da reprodução de *C. carnea* no tratamento Sumicidin Alpha a 60 ml/ha (Teste B). Postura (em 24 h): fêmeas e machos por gaiola; ovos obtidos, viáveis e inviáveis; larvas mortas na eclosão, fertilidade (%) e ovos/fêmea.dia (fecundidade). Fertilidade (viabilidade) de ovos.

24 h de postura (período)*	fêmeas / gaiola **	machos / gaiola	número de ovos	ovos viáveis	ovos inviáveis	larvas recém-eclodidas mortas	fertilidade (%)	fecundidade ovos / fêmea . dia
01/02-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
04/05-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
07/08-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
10/11-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
13/14-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
16/17-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
19/20-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
22/23-MAR	7	6	0	-	-	-	-	-
MÉDIA	7	-	-	-	-	-	-	-
FERTILIDADE DE OVOS	-	-	-	-	-	-	-	-

* 8:00 h

** não ovipositaram

Nos dois testes, para o cálculo do efeito total (E) foi usada a fórmula de Overmeer & Zon, modificada por Vogt (1992):

De acordo com o critério da IOBC, Sumicidin Alpha 50 EC a 60 ml/ha, Sumicidin Alpha 50 EC a 100 ml/ha e Perfekthion 400 EC a 40 ml/ha foram Classe 4. Todos foram classificados como nocivos, por promoverem redução na capacidade benéfica superior a 99%, no teste de toxicidade a larvas de *C. carnea*.

4.3 Sumário dos resultados

4.3.1 Experimentos com *Trichogramma cacoeciae*

A metodologia experimental tem reprodutibilidade quando conduzida com os parâmetros experimentais padronizados.

4.3.1.1 Toxicidade a adultos

- Aliette (1,375%) foi Classe 3 - a 2 mg/cm²;
- Aliette (1,375%) foi Classe 2 - a 1,5 mg/cm²;
- Aliette (0,75%) foi Classe 2;
- Afugan (0,4%) foi Classe 4;
- Neem Azal (0,5%) foi Classe 2;

4.3.1.2 Toxicidade a pupas

- Aliette (1,375%) foi Classe 1;

4.3.1.3 Persistência

- Telmion (4%), Scala (0,5%) e Vertimec (0,375%) foram Classe 2;
- Zolone (0,24%), Polo (0,10%), Euparen (0,625%), Dithane (0,9%), Kumulus (2,0%) e Thiram (0,8%) foram Classe 4;

4.3.1.4 Parâmetros experimentais padronizados

- número de adultos da população inicial: 350 ± 50 insetos/gaiola;
- número e frequência da distribuição de ovos ofertados para o parasitismo: 18.000 ovos/gaiola (9.000 ovos no segundo, 6.000 no terceiro e 3.000 no quinto dia);
- luminosidade: difusa e contínua (24h) sobre as gaiolas, com 2500 Lux (3 primeiras horas) e 500 Lux (durante o teste);
- ventilação: 1 bomba de vácuo (1 l/min) para 4-8 gaiolas;
- período mínimo de contato: 6 horas.

4.3.2 Experimentos com larvas de *C. carnea*

- Sumicidin 60, Sumicidin 100 e Perfekthion foram Classe 4;

4.4 Considerações finais

Os testes de laboratório são o primeiro passo na avaliação do potencial de risco de um pesticida para a fauna de artrópodos não-alvo. O organismo-teste deve ser confinado em um resíduo seco e fresco do produto, sob condições que reflitam o mais elevado nível de contato possível de ser experimentado no campo. Testes laboratoriais adicionais podem ser conduzidos sob condições mais realísticas (laboratoriais ampliados) para suplementar dados já obtidos.

A combinação de todos os tipos de experimentos com o organismo benéfico completaria o conhecimento do impacto do pesticida para a espécie. Também convém ressaltar que o método do teste deve ser adaptado ao modo de ação do produto, assim, por exemplo, produtos neurotóxicos devem ser testados diferentemente dos reguladores de crescimento de insetos.

Como o desenvolvimento de uma população de artrópodos não é exclusivamente influenciado pela mortalidade, os testes devem incluir uma avaliação do efeito subletal em indivíduos sobreviventes, por exemplo fecundidade, taxas de parasitismo ou atividade alimentar.

O substrato teste deve ser de um material inerte, como vidro ou areia quartzosa. Os organismos em teste devem ser oriundos de culturas de laboratório, com idade e condições uniformes. O conhecimento do genótipo do inimigo natural e sua variabilidade reprodutiva são essenciais; aplicar o controle de qualidade, obedecendo testes padronizados (Apêndice 1), para acompanhar a população criada em laboratório é fundamental.

Tratamentos repetidos não podem ser simulados simplesmente dobrando-se a dosagem/dose. A multiplicação de dosagens/dose não dará o mesmo resultado de um tratamento repetido, pelo fato dos estágios de vida no campo diferirem em ambos os momentos da aplicação, por exemplo.

A padronização do equipamento de pulverização é prioritária.

Os testes devem ser conduzidos nas condições ambientais ótimas, devendo ser registradas; alimentação e ventilação adequadas devem ser fornecidas.

É conveniente afirmar que os testes de laboratório oferecem muito boa indicação do comportamento do pesticida no campo.

5 CONCLUSÕES

- Os métodos de pesquisa da IOBC/WPRS visando os testes de seletividade com pesticidas mostram, em geral, estabilidade de resultados, o que permite a adoção dos mesmos;
- A reprodutibilidade dos experimentos tem uma dependência estreita da utilização de parâmetros experimentais padronizados;
- O parasitóide *T. cacoeciae* e o predador *C. carnea* são materiais biológicos adequados aos testes de seletividade preconizados pela IOBC/WPRS;
- Com base neste trabalho, são sugeridos aprimoramentos nos testes de seletividade de pesticidas a *T. cacoeciae* e *C. carnea* utilizados na IOBC/WPRS, tornando-os mais práticos, precisos e reprodutíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.
- ALVES, S.B. (Coord.) **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Ed. Manole, 1986. 407 p.
- BARTLETT, B.R. Laboratory studies on selective aphicides favoring natural enemies of the spotted alfalfa aphid. **Journal of Economic Entomology**, v.51, n.3, p.374-378, 1958.
- BATISTA, G.C. de. **Fundamentos de química e toxicologia dos inseticidas**. Piracicaba: ESALQ, Depto de Entomologia. 1974. 257p.
- BATISTA, G.C. de. Seletividade de inseticidas e manejo integrado de pragas. In: CRÓCOMO, W.B. (Org.) **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP; CETESB, 1990. p. 199-213.
- BELLOWS, T.S.; MORSE, J.C.; HADJIDEMETRIOU, D.G.; IWATA, Y. Residual toxicity of four insecticides used for control of citrus thrips (Thysanoptera -Thripidae) on three beneficial species in a citrus agroecosystem. **Journal of Economic Entomology**, v.78, n.3, p.681-688, 1985.

BOGENSCHÜTZ, H. Prüfung des Einflusses von Pflanzenschutz mitteln auf Nutzinsekten. **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.77, p.438-444, 1975.

BOGENSCHÜTZ, H. Über die Wirkung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf die Parasitierungsleistung der Schlupfwespe *Coccygominus turionellae*. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v.36, p.65-67, 1984.

BOGENSCHÜTZ, H.; ALBERT, R.; HRADETZKY, J.; KUBLIN, E. Ein Beitrag zur Prüfung der unerwünschten Wirkung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Nutzarthropoden im Laboratorium. **Agrar- und Umweltforschung in Baden-Württemberg**, v.11, p.5-25, 1986.

BONESS, M.; ENGLERT, W.D.; HAUB, G.; LYRE, H.; SCHROPP, A.; SCHRUF, G.; WIRTH, W.; STELLWAAG-KITTLER, F. **Richtlinie für die Prüfung der Auswirkung von Pflanzenbehandlungsmitteln auf Raubmilben im Weinbau**. Braunschweig: BBA. 1982.

CHIANG, H.C. Insects and their environment. In: PFADT, R.E. (Ed.) **Fundamentals of applied entomology**. New York: Macmillan, 1985. p.128-161.

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13., Recife, 1991. **Resumos**. Recife: SEB, 1991. 2v.

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., Piracicaba, 1993. **Resumos**. Piracicaba: SEB, 1993. 807p.

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15., Caxambu, 1995. **Resumos**. Caxambu: SEB, 1995. 809p.

- CROFT, B.A. ; BROWN, A.W.A. Responses of arthropod natural enemies to insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.20, p.285-335, 1975.
- CROFT, B.A. **Arthropod biological control agents and pesticides**. New York: John Wiley, 1990. 723p.
- DeBAACH, P. **Biological control by natural enemies**. Cambridge: Cambridge University Press, 1974. 323p.
- DEGRANDE, P.E. (Ed.) **Bicudo do algodoeiro: manejo integrado**. Dourados: UFMS; EMBRAPA, 1991. 141p.
- DEGRANDE, P.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.; HASSAN, S.A. Methods to test the side effects of pesticides on *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Org.) **Curso de controle biológico com *Trichogramma***. Piracicaba: ESALQ, Depto. de Entomologia. 1996a. p.63-74.
- DEGRANDE, P.E.; HASSAN, S.A. Optimization of the IOBC method to teste the side-effects of pesticides on *Trichogramma* spp. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Posters**. Foz do Iguaçu: EMBRAPA, CNPSo, 1996b. p.56.
- DE NEGRI, J.D. A extensão rural no MIP-Citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS-MIP, 3., Bebedouro. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p.269-275.

- DITTRICH, V.A. A comparative study of toxicological test methods on a population of the two-spotted spider mite (*Tetranychus telarius*). **Journal of Economic Entomology**, v.55, n.5, p.644-648, 1962.
- DOUTT, R.L. Biological control. In: KILGORE, W.W. ; DOUTT, R.L. (Ed.) **Pest control: biological, physical, and selected chemical methods**. New York: Academic Press, 1967. p 3-30.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Entomologia. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 14., Campo Grande, 1992. **Atas**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 1993a. p.87-91. (EMBRAPA/CNPSo. Documentos, 56).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Controle de doenças e pragas. In: REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 9., Dourados, 1993. **Recomendações**. Dourados: EMBRAPA, UEPAE, 1993b. p.84-91. (EMBRAPA/UEPAE Dourados. Documentos, 57).
- FINNEY, D.J. **Probit analysis: statistical treatment of the sigmoid response curve**. London: Cambridge University Press. 1964.
- FRANZ, J. Pesticides and beneficial arthropods. **IOBC/WPRS Bulletin**, n.1, p.147-152, 1975.
- FRANZ, J.M.; FABRITIUS, K. Die prüfung der empfindlichkeit von entomophagen gegenüber pestiziden - Versuche mit *Trichogramma*. **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.68, p.278-288, 1971.

FRANZ, J.M.; BOGENSCHÜTZ, H.; HASSAN, S.A.; HUANG, P.; NATON, E.; SUTER, H.; VIGGIANI, G. Results of a joint pesticide test programme by the working group: pesticides and beneficial arthropods. **Entomophaga**, v.25, n.3, p.231-236, 1980.

GAZZONI, D.L. Pesquisa em seletividade de inseticidas no Brasil: uma abordagem conceitual e metodológica. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. **Anais**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1994. p.119-124.

GRAHAM-BRYCE, I.J. Chemical methods. In: BURN, A.J.; COAKER, T.H.; JEPSON, P.C. (Ed.) **Integrated pest management**. London: Academic Press, 1987. p.113-159.

GRAVENA, S. Controle biológico no manejo integrado de pragas. **Pesq. agropec. bras.**, v.27, p.281-299, 1992.

GRAVENA, S.; LARA, F.M. Controle integrado de pragas e receituário agrônomo. In: GRAZIANO NETO, F. (Coord.) **Uso de agrotóxico e receituário agrônomo**. São Paulo: Agroedições, 1982. p.123-160.

HASSAN, S.A. Eine methode zur Prüfung der Einwirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Eiparasiten der Gattung *Trichogramma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). Ergebnisse einer Versuchsreihe mit Fungiziden. **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.76, p.120-134, 1974.

HASSAN, S.A. Standardized techniques for testing side-effects of pesticides on beneficial arthropods in the laboratory. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.84, p.158-163, 1977.

HASSAN, S.A. Reproduzierbare Laborverfahren zur Prüfung der Schadwirkungsdauer von Pflanzenschutzmitteln auf Eiparasiten der Gattung *Trichogramma* (Hymenoptera,

Trichogrammatidae). **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.89, n.3, p.281-289, 1980.

HASSAN, S.A.. Procedure for testing side effects of pesticides on beneficial arthropods as being considered by the International Working Group "Pesticides and Beneficial Arthropods". **Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie**, v.4, p.86-88, 1983.

HASSAN, S.A. Guideline for testing the side effect of pesticides on the egg parasite *Trichogramma cacoeciae*. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.11, n.4, p.3-18, 1988.

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

HASSAN, S.A. Guideline for the evaluation of side-effects of plant protection product on *Trichogramma cacoeciae*. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.15, n.3, p.18-39, 1992.

HASSAN, S. A. The effects of pesticides on beneficial organisms: activities of the IOBC International Working Group. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. **Anais**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1994a. p.114-118.

HASSAN, S.A. Production of the angoumois grain moth *Sitotroga cerealella* (Oliv.) as an alternative host for egg parasites. In: GERDING, P.M. (Ed.) Taller Internacional Producción y utilización de *Trichogramma* para el controle biológico de plagas. Chillán: INIA/Quilamapu, 1994b. p.20-26.

HASSAN, S.A. Mass production of *Trichogramma*: breeding of the angoumois grain moth *Sitotroga cerealella* (Oliv.) as an alternative host. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.

(Org.) **Curso de controle biológico com *Trichogramma***. Piracicaba: ESALQ, Depto. de Entomologia. 1996. p.45-54.

HASSAN, S.A.; FRANZ, J.M. Die Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Eiparasiten der Gattung *Trichogramma* - Prüfmethode und Ergebnisse. **Mitteilungen Biologische Bundesanstalt Land- Forstwirtschaft**, n.151, p.196-197, 1973.

HASSAN, S.A.; BIGLER, F.; BLAISINGER, P.; BOGENSCHÜTZ, H.; BRUN, J.; CHIVERTON, P.; DICKLER, E.; EASTERBROOK, M.A.; EDWARDS, P.J.; ENGLERT, W.D.; FIRTH, S.I.; HUANG, P.; INGLESFIELD, C.; KLINGAUF, F.; KÜHNER, C.; LEDIEU, M.S.; NATON, E.; OOMEN, P.A.; OVERMEER, W.P.J.; PLEVOETS, P.; REBOULET, J.N.; RIECKMANN, W.; SAMSOE-PETERSEN, L.; SHIRES, S.W.; STÄUBLI, A.; STEVENSON, J.; TUSET, J.J.; VANWETSINKEL, 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/WPRS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **EPPO Bulletin**, v.15, p.214-255, 1985.

HASSAN, S.A.; ALBERT, R.; BIGLER, F.; BLAISINGER, P.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J.; CHIVERTON, P.; EDWARDS, P.J.; ENGLERT, W.D.; HUANG, P.; INGLESFIELD, C.; NATON, E.; OOMEN, P.A.; OVERMEER, W.P. J.; RIECKMANN, W.; SAMSOE-PETERSEN, L.; STÄUBLI, A.; TUSET, J.J.; VIGGIANI, G.; VANWETSWINKEL, G. Results of the third joint pesticide testing programme by the IOBC/WPRS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.103, p.92-107, 1987.

HASSAN, S.A.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J.; CHIVERTON, P.; EDWARDS, P. J.; MANSOUR, F.; NATON, E.; OOMEN, P.A.; OVERMEER, W.P.J.; POLGAR, L.; RIECKMANN, W.; SAMSOE-PETERSEN, L.; STÄUBLI, A.; STERK, G.; TAVARES, K.; TUSET, J.J.; VIGGIANI, G.; VIVAS, A.G. Results of the fourth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-

Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.105, p.321-329, 1988.

HASSAN, S.A.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J.; CALIS, J.N.M.; CHIVERTON, P.; COREMANS-PELSENEER, J.; DUSO, C.; LEWIS, G.B.; MANSOUR, F.; MORETH, L.; OOMEN, P.A.; OVERMEER, W.P.J.; POLGAR, L.; RIECKMANN, W.; SAMSOE-PETERSEN, L.; STÄUBLI, A.; STERK, G.; TAVARES, K.; TUSET, J.J.; VIGGIANI, G. Results of the fifth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Entomophaga**, v.36, n.1, p.55-67, 1991.

HASSAN, S.A.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J.; CALIS, J.N.M.; COREMANS-PELSENEER; DUSO, C.; GROVE, A.; HEIMBACH, U, J.; HELYER, N.; HOKKANEN, H.; LEWIS, G.B.; MANSOUR, F.; MORETH, L.; POLGAR, L.; SAMSOE-PETERSEN, L.; SAUPHANOR, B.; STÄUBLI, A.; STERK, G.; VAINIO, A.; van de VEIRE, M.; VIGGIANI, G; VOGT, H. Results of the sixth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Entomophaga**, v.39, n.1, p.107-119, 1994.

HASSEL, M.P.; WAAGE, J.K. Host-parasitoid population interactions. **Annual Review of Entomology**, v.29, p.89-114, 1984.

HEIMBACH, U. Nebenwirkungen einiger Fungizide auf Insekten. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v.40, p.180-183, 1988.

HIGLEY, L.G.; KARR, L.L.; PEDIGO, L.P. **Manual of entomology and pest management**. New York: Macmillan, 1989. 282 p.

HOOGCARSPER, A.P.; JOBSEN. Laboratory method for testing the side effects of pesticides on *Encarsia formosa* (Hymenoptera, Aphelinidae). Results with pesticides used

on tomato in glasshouses in the Netherlands. **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.97, p.266-278, 1984.

HOY, M.A. & CONLEY, J. Toxicity of pesticides to western predatory mite. **California Agriculture**, v.41, n.7/8, p.12-14, 1987.

HUANG, P. Zur Laborzucht von *Pales pavidus* Meig. (Dipt. : Tachinidae) am Ersatzwirt *Galleria mellonella* L. (Lep.: Galleriidae). **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.8, p.177-188, 1981.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR BIOLOGICAL CONTROL. WEST PALAEARCTIC REGIONAL SECTION. Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms", Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial: short description of test methods. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.11, n.4, p.1-143, 1988.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR BIOLOGICAL CONTROL. WEST PALAEARCTIC REGIONAL SECTION. Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms", Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: description of test methods. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.15, n.3, p.1-186, 1992.

JEPPSON, L.R.; McMURTHY, J.A.; MEAD, D.W.; JESSER, M.J.; JOHNSON, H.G. Toxicity of citrus pesticides to some predaceous phytoseiid mites. **Journal of Economic Entomology**, v.68, n.5, p.707-710, 1975.

JEPSON, P.C. (Ed.) **Pesticides and non-target invertebrates**. Andover: Intercept, 1989. 240p.

KOGAN, M. MIP: sistema multidimensional de produção vegetal. **Defesa Vegetal**, v.35, n.7, p.3-5, 1993.

- LINGREN, P.D.; RIDGWAY, R.L. Toxicity of five insecticides to several insect predators. **Journal of Economic Entomology**, v.60, n.6, p.1639-1641, 1967.
- MANSOUR, F.; NENTWIG, W. Effects of agrochemical residues on four spider taxa: Laboratory methods for pesticide tests with web-building spiders. **Phytoparasitica**, v.16, p.317-325, 1988.
- METCALF, R.L. Insecticides in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMAN, W. H. (Ed.) **Introduction to insect pest management**. 2.ed. New York: John Wiley, 1982. p. 217-277.
- NAKANO, O. Avanços na prática do controle de pragas. **Informe Agropecuário**, v.12, n.140, p.55-59, 1986.
- NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia econômica**. Piracicaba: Livroceres, 1981. 314p.
- NAKANO, O.; TREVIZAN, L.R.P.; MOURA, E. Impacto de Rufast 50 SC sobre artrópodos não alvo na cultura de citros. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. **Anais**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1994a. p.331.
- NAKANO, O.; VENDRAMINI, J.M.B.; MARQUÊS, G.B.C. Efeito de Rufast 50 SC sobre artrópodos não alvo na cultura de citros. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. **Anais**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1994b. p.330.
- NATON, E. Testing the side-effects of pesticides on *Phygadeuon trichops*. **Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzen-und Umweltschutz vereinigt mit Schadlingbekämpfung**, v.56, p.82-91, 1983.

- NEUBECKER, F. Beitrag zur technik der Massenzucht de Getreidemotte *S. cerealella* (Oliv.). **Anzeiger für Schädlingkunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v.40, p.104-110, 1967.
- OOMEN, P. Guideline for evaluation of side-effects of pesticides: *Encarsia formosa*. **EPPO Bulletin**, v.15, p.257-265, 1985.
- OVERMEER, W.P.J.; ZON, A. Q. van. A standardized method for testing the side effects of pesticides on the predacious mite *Amblyseius potentillae* Garman (Acarina : Phytoseiidae). **Entomophaga**, v.27, p.357-364, 1982.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação e produção massal de inimigos naturais. In: CRÓCOMO, W.B. (Org.) **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP, CETESB, 1990. p.117-146.
- PARRA, J.R.P. Criação massal de inimigos naturais. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., Campinas, 1992. Campinas: Fundação Cargill, 1992. p.5-20.
- PARRA, J.R.P. O controle biológico aplicado e o manejo integrado de pragas. In: SIMPÓSIO DE AGRICULTURA ECOLÓGICA, 1., Campinas, 1993. Campinas: Fundação Cargill, 1993. p. 116-139.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, Departamento de Entomologia. 1996. 137p.
- PLATTNER, H.C.; NATON, E. Zur Prüfung der Auswirkung von Pflanzenschutzmittein auf Nutzarthropoden. **Bayrisches Landandwirtschaftliches Jahrbuch**, p.143-147, 1975.

- REIS, P.R. Aspectos bioecológicos e seletividade de agroquímicos a *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma, 1972 (Acari: Phytoseiidae). Piracicaba, 1996. 154p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RIECHERT, S.E.; LOCKLEY, T. Spiders as biological control agents. **Annual Review of Entomology**, v.29, p.299-320, 1984.
- RIPPER, W.E.; GREENSLADE, R.M.; HARTLEY, G.S. Selective insecticides and biological control. **Journal of Economic Entomology**, v.44, n.4, p. 448-458, 1951.
- ROSEN, D.; GERSON, V. Field studies of *Chilocorus bipustulatus* on citrus in Israel. **Annales des Epiphyties**, v.16, p.71-76, 1965.
- SAMSOE-PETERSEN, L. Laboratory method for testing side effects of pesticides on juvenile stages of the predatory mite, *Phytoseiulus persimilis* (Acarina, Phytoseiidae) based on detached bean leaves. **Entomophaga**, v.28, p.167-178, 1983.
- SAMSOE-PETERSEN, L. Laboratory method for testing side-effects of pesticides on the rove beetle *Aleochara bilineata*-adults. **Entomophaga**, v.32, p.73-81, 1987.
- SAMSOE-PETERSEN, L.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BRUN, J.; HASSAN, S.A.; KÜHNER, C.; MANSOUR, F.; NATON, E.; OOMEN, P.A.; OVERMEER, W.P.J.; POLGAR, L.; RIECKMANN, W.; STÄUBLI, A. Laboratory rearing techniques for 16 beneficial arthropod species and their prey/hosts. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.96, n.3, p.289-316, 1989.
- SOARES, J.F.; FARIAS, A.A.; CÉSAR, C.C. **Introdução a estatística**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 378p.

STÄUBLI, A.; HÄCHLER, M.; ANTONIN, P.; MITTAZ, C. Tests de nocivité de divers pesticides envers ennemis naturels des principaux ravageurs des vergers de poiriers en Suisse romande. **Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture**, v.16, p.279-286, 1984.

STEIN, W. Der Einfluß verschiedener Schädlingsbekämpfungsmittel auf Eiparasiten der Gattung *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae). **Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz** v.34, p.87-89, 1961.

SUTER, H. Prüfung der Einwirkung von Pflanzenschutzmitteln auf die Nutzhymenopterenart *Chrysopa carnea* Steph. (Neuroptera : Chrysopidae). Methodik und Ergebnisse. **Schweiz. landw. Forschung**, v.17, p.37-44, 1978.

TUSET, J.J. Effets d'inhibition du développement du champignon *Cephalosporium lecanii* Zimm. "in vitro" causés par des produits antiparasitaires. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 8., Moscow, 1975. **Biological and Genetic Control**. Moscow: IPPC, 1975. p. 201-8.

ULRICH, H. Versuche über die empfindlichkeit von *Trichogramma* (Hymenoptera, Chalcidoidea) gegenüber fungiziden. **Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v.41, p.101-106, 1968.

Van den BOSCH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. 247 p.

VIGGIANI, G.; TRANFAGLIA, A. A method for laboratory test of side-effects of pesticides on *Leptomastix dactylopii* (How.) (Hym. : Encyrtidae). **Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri Portici**, v.35, p.8-15, 1978.

- VOGT, H. Untersuchungen zu Nebenwirkungen von Insektiziden und Akariziden auf *Chrysoperla carnea* Steph. (Neuroptera: Chrysopidae). **Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent**, v. 57, n. 2b, p.559-67, 1992.
- WAAGE, J.K.; HASSEL, M.P.; GODFRAY, H.C.J. The dynamics of pest-parasitoid-insecticide interactions. **Journal of Applied Ecology**, v.22, p.825-838, 1985.
- WELLING, W.; PATERSON, G.D. Toxicodynamic of insecticides. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.) **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press. 1985. v.12, p.603-645.
- YAMAMOTO, P.T; PINTO, A.S; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Seletividade de agrotóxicos aos inimigos naturais de pragas dos citros. **Laranja**, v.13, p.709-755, 1992.

APÊNDICE

1. Parasitismo, emergência e razão sexual (população inicial)											
AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	média
total de ovos	422	471	399	514	342	466	398	460	488	404	436,4
ovos parasitados	356	439	329	418	317	429	353	391	419	329	378
taxa de parasitismo (%)	84,36	93,21	82,46	81,32	92,69	92,06	88,69	85,00	85,86	81,44	86,62
fêmeas emergidas	318	358	264	340	255	334	292	334	337	252	308,4
machos emergidos	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
razão sexual (%fêmeas)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
taxa de emergência (%)	89,32	81,55	80,24	81,34	80,44	77,86	82,72	85,42	80,43	76,60	81,58
2. Capacidade de parasitismo (fêmeas), em <i>S. cerealella</i> , fêmeas isoladas em 5 dias de teste											
AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ovos/fêmea	28	22	26	24	30	28	25	17	30	27	
AMOSTRA	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	média
ovos/fêmea	12	23	31	28	28	22	29	33	16	24	25,15
% sobreviventes no dia 7	73%										
3. Capacidade de parasitismo (fêmeas), em <i>Cydia pomonella</i> , fêmeas isoladas em 4 h de teste											
AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ovos/fêmea	5	4	6	8	4	6	7	4	6	5	
AMOSTRA	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	média
ovos/fêmea	4	5	6	6	3	4	3	6	0	5	4,85

Apêndice 1 - Exemplo de aplicação do "programa da IOBC de controle de qualidade" para *Trichogramma*, na população inicial, para testes de seletividade.

Apêndice 2 - Videiras tratadas (um tratamento), cv. Müller-Thurgau, cultivadas em vasos sob condições de casa de vegetação nos experimentos de laboratório-ampliado (persistência).

Apêndice 3 - Tubo de emergência escurecido (encapado) e conectado na gaiola de contato (com folhas de videira no interior - experimento de persistência de pesticidas a *T. cacoeciae*).

Apêndice 4 - Sistema com as gaiolas de contato, conexões e mangueiras (ver os cartões de papel com círculos de ovos no interior das gaiolas).

Apêndice 5 - Cartões de papel com ovos de *S. cerealella* para mensurar os resultados (direita: cartão de papel com ovos de *S. cerealella* (1 dia) não parasitados; esquerda: cartão com ovos parasitados por *T. cacoeciae*).

Apêndice 6 - Cartões de papel com círculos de ovos de *S. cerealella* parasitados (esquerda) e não parasitados por *T. cacoeciae* (direita), para a confecção dos tubos de emergência (população inicial).

Apêndice 7 - Cartões de papel com círculos de ovos para avaliação de resultados (ovos de *S. cerealella* parasitados).

Apêndice 8 - Cartões de papel com círculos de ovos obtidos de uma repetição (gaiola de contato) no final do experimento. Cerca de 18.000 ovos de *S. cerealella* oferecidos para parasitismo/parcela: no segundo dia (dia seguinte ao tratamento) três cartões de papel, no terceiro dia foram oferecidas dois cartões de papel e no quinto apenas um cartão.

Apêndice 9 - Unidade de teste para experimentação com *C. carnea*.

Apêndice 10 - Detalhe da arena de contato das larvas de *C. carnea* com o pesticida.

Apêndice 11 - Infestação de larvas de *C. carnea* na unidade de teste

Apêndice 12 - Detalhe da alimentação das larvas de *C. carnea* na unidade de teste

Apêndice 13 - Gaiola de reprodução de *C. carnea*.