**EFEITO DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS E ISOLADOS DE
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE O CUPIM
SUBTERRÂNEO *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858)
(ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)**

ENRIQUE ARIEL CASTIGLIONI ROSALES

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de
Concentração: Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro - 2001

**EFEITO DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS E ISOLADOS DE
FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE O CUPIM
SUBTERRÂNEO *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858)
(ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)**

ENRIQUE ARIEL CASTIGLIONI ROSALES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JOSÉ DJAIR VENDRAMIM**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área de Concentração:
Entomologia.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Castiglioni Rosales, Enrique Ariel
Efeito de derivados de meliáceas e isolados de fungos
entomopatogênicos sobre o cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis*
(Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae) / Enrique Ariel Castiglioni Rosales. - -
Piracicaba, 2001
133 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Cupim 2. Extratos 3. Fungos entomopatogênicos 4. Meliaceae I. Título

CDD 634.97325

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A Negra y Yakie, mis padres,
a Eddi, Marcela, Daniel y Gabriel,
por su amor, paciencia y coraje,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, a quem devo a oportunidade única dessa formação profissional, e eterna gratidão pela orientação, estímulo, confiança, respeito e ensinamentos, cotidianos e permanentes.

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves pela facilidade para trabalhar na área de controle microbiano e, principalmente, por ter me ensinado a gostar dela.

À Bióloga Solange Aparecida Vieira, técnica do Laboratório de Patologia de Insetos, pelo auxílio permanente -e indispensável- na elaboração dos experimentos.

À "Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay", pelo afastamento e apoio econômico, indispensáveis para concretizar esse curso de pós-graduação e ao Ministério de Educação e Cultura do Brasil, pela bolsa de estudos PEC/PG, que possibilitou a execução desse doutorado.

À Prof. Dra. Marinéia de Lara Haddad, pelas orientações e sugestões na análise estatística dos dados.

Ao Dr. Newton Macedo, pelas sugestões e facilidade do local para realização das avaliações de campo.

Ao colega e amigo Ariel J. Castro, pelo auxílio na elaboração dos "Summaries", e por ter sido meu "ombro virtual".

Aos Professores do Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ, pelos valiosos ensinamentos e o fino trato dispensados ao longo do Curso.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino e ao pessoal da Divisão de Biblioteca e Documentação da ESALQ, pelo auxílio no tratamento da informação.

Aos colegas do Setor de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas: Marilene, Cia, Rita, Paulo, Rogério, Fábio, Antônio, Uemerson, Márcio e Romildo, pelo estímulo e companheirismo.

Aos colegas do Setor de Patologia de Insetos: Ricardo, Rogério, Marco, Marcel, Marcos, Daniella, Luciana, Elizabeth, Adriana, Melissa, Luiz Eduardo, Marcelo e Leonardo, pela amizade, estímulo e sugestões permanentes.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Entomologia, especialmente aos amigos Marcelo, Ricardo, Jerson, Diogo, Fernando, Miguel, Jorge, Ranyse e Denise, pela experiência inolvidável de convívio e as lembranças que guardarei eternamente no coração.

À pequena família: Marcelo e Ricardo e à "Pós-Doc": Marcelo, Alex e Alan que, pela influência na paz da minha alma, também colaboraram com a concretização dos resultados que hoje estão no papel.

A Deus, que se fez presente em todas as pessoas citadas e nos demais colaboradores anônimos desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Ocorrência e controle <i>Heterotermes tenuis</i>	3
2.2 Efeito de extratos vegetais sobre cupins.....	7
2.3 Efeito de extratos vegetais sobre entomopatógenos.....	13
2.4 Efeito associado de inseticidas e fungos entomopatogênicos sobre cupins.....	18
3 TOXICIDADE E REPELÊNCIA DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS PARA <i>Heterotermes tenuis</i>	25
Resumo.....	25
Summary.....	26
3.1 Introdução.....	26
3.2 Material e métodos.....	28
3.2.1 Toxicidade de derivados de meliáceas para <i>H. tenuis</i>	28
3.2.2 Repelência de <i>H. tenuis</i> para derivados de meliáceas	29
3.2.3 Transmissão do Nimkol-L entre operários de <i>H. tenuis</i>	32
3.3 Resultados e discussão.....	34
3.3.1 Toxicidade de derivados de meliáceas para <i>H. tenuis</i>	34
3.3.2 Repelência de <i>H. tenuis</i> para derivados de meliáceas	41

3.3.2.1. Testes em placas com ágar.....	41
3.3.2.2. Testes em arenas de preferência.....	44
3.3.2.3. Testes em placas sem ágar.....	50
3.3.3 Transmissão do Nimkol-L entre operários de <i>H. tenuis</i>	55
3.4 Conclusões.....	58
4 COMPATIBILIDADE DO NIMKOL-L COM ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> E <i>Metarhizium anisopliae</i>	59
Resumo.....	59
Summary.....	59
4.1 Introdução.....	60
4.2 Material e métodos.....	61
4.2.1 Crescimento de colônias e produção de conídios.....	62
4.2.2 Classificação da toxicidade do Nimkol-L para os fungos entomopatógenos.....	63
4.2.3 Germinação de conídios.....	63
4.3 Resultados e discussão.....	64
4.3.1 Crescimento de colônias e produção de conídios.....	64
4.3.2 Classificação da toxicidade do Nimkol-L para os fungos entomopatógenos.....	68
4.3.3 Germinação de conídios.....	70
4.4 Conclusões.....	71
5 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS E FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>Heterotermes tenuis</i>	72
Resumo.....	72
Summary.....	73
5.1 Introdução.....	73
5.2 Material e métodos.....	75
5.2.1 Efeito associado de derivados de meliáceas e fungos entomopatogênicos sobre <i>H. tenuis</i> em laboratório.....	75

5.2.2 Efeito do Nimkol-L e de fungos entomopatogênicos sobre <i>H. tenuis</i> em condições de campo.....	77
5.3 Resultados e discussão.....	79
5.3.1 Efeito associado de derivados de meliáceas e fungos entomopatogênicos sobre <i>H. tenuis</i> em laboratório.....	79
5.3.2 Efeito do Nimkol-L e de fungos entomopatogênicos sobre <i>H. tenuis</i> em condições de campo.....	95
5.4 Conclusões.....	101
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
APÊNDICES.....	123

**EFEITO DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS E ISOLADOS DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE O CUPIM SUBTERRÂNEO *Heterotermes
tenuis* (HAGEN, 1858) (ISOPTERA: RHINOTERMITIDAE)**

Autor: ENRIQUE ARIEL CASTIGLIONI ROSALES

Orientador: Prof. JOSÉ DEJAIR VENDRAMIM

RESUMO

Esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o efeito de derivados das meliáceas *Azadirachta indica* (nim), *Melia azedarach* e *Trichilia pallida* e os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (isolado 1037) e *Beauveria bassiana* (isolado 634) visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis*. Os derivados vegetais foram avaliados em relação à toxicidade e repelência para o cupim. A formulação comercial Nimkol[®], à base de folhas de nim, foi tóxica para o cupim, em concentrações de 0,3% de ingrediente ativo ou superiores. Não foi constatada a transmissão do Nimkol de indivíduos alimentados com esse produto para outros indivíduos. Os demais extratos vegetais estudados não apresentaram toxicidade significativa para *H. tenuis*. Nenhum dos produtos avaliados foi repelente a ponto de evitar a construção de galerias em placas com ágar ou provocar o fechamento das mesmas. Entretanto, em testes de escolha em arenas de preferência, *H. tenuis* demonstrou repelência pelo extrato aquoso de folhas de nim (5%). Os demais derivados avaliados, incluindo o Nimkol, não foram repelentes para o cupim. O efeito dos derivados vegetais e dos entomopatógenos na sobrevivência de

H. tenuis, em forma independente e associada, foi estudada em laboratório e em condições de campo, visando avaliar um possível efeito estressor dos derivados vegetais sobre o cupim. Testes de compatibilidade *in vitro* indicaram resposta dependente da concentração do Nimkol, para a inibição do crescimento de colônias, da produção e da germinação de conídios dos entomopatógenos. A associação de extratos vegetais e entomopatógenos, em geral, diminuiu a atividade fungitóxica sobre *H. tenuis*. Entretanto, observou-se benefícios da associação de Nimkol (0,2 a 0,4% i.a.) com os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* quando houve um mínimo de 24 horas de diferença entre a aplicação do produto vegetal e dos fungos no alimento dos cupins. Os resultados de campo para Nimkol, *M. anisopliae* e a associação de ambos, mostraram tendências semelhantes às observadas para esses tratamentos em laboratório, embora com menores níveis de mortalidade.

EFFECT OF BY-PRODUCTS OF MELIACEAE AND ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATES ON THE SUBTERRANEAN TERMITE *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858) (ISOPTERA: RHINOTHERMITIDAE)

Author: ENRIQUE ARIEL CASTIGLIONI ROSALES

Adviser: PROF. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the effect of by-products of the Meliaceae *Azadirachta indica* (neem), *Melia azedarach* and *Trichilia pallida*, and of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (isolate 1037) and *Beauveria bassiana* (isolate 634) in the control of the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. The vegetal by-products were evaluated in relation to the toxicity and repellency for the termite. The commercial formula Nimkol[®], obtained from neem leaves, was toxic for the termite at concentrations of 0.3% a.i. and higher. There was no detected transmission of the Nimkol from individuals fed with the product to other individuals. The rest of the vegetal extracts were not significantly toxic for *H. tenuis*. None of the tested products was repellent to the extent of preventing the gallery construction in agar plates or causing them to be closed. In selection experiments on preference, *H. tenuis* showed repellency towards the aqueous extract of neem leaves (5%). The rest of the by-products tested, including Nimkol-L, were not repellent for the termite. The effect of the vegetal by-products and the entomopathogens, independently

and associated, was studied under field and laboratory conditions, looking for a possible stressing effect of the vegetal by-products on the termite. *In vitro* compatibility tests showed a response of the Nimkol-L, dependent on the concentration, on the growth of colonies, production and germination of conidia of the entomopathogens. The association of entomopathogens and vegetal extracts decreased in general the toxic activity of the fungi over *H. tenuis*. With a minimal difference of 24h between the application of the vegetal product and the fungi in the food of the termites, a beneficial association was detected between Nimkol-L and isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae*. The field results for Nimkol-L, *M. anisopliae* and the combination of the two, showed a trend similar to the one observed in the laboratory results, but with lower mortality levels.

1 INTRODUÇÃO

O cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae) vem sendo considerado uma das pragas mais importantes da cultura canavieira no Estado de São Paulo. Os danos causados e, conseqüentemente sua importância econômica, aumentaram após a proibição do uso de inseticidas organoclorados, em meados dos anos 80 (Moino Júnior, 1998).

O ataque produzido em cana-de-açúcar por *H. tenuis* na época do plantio, no período de maturação e após o corte, pode levar a perdas na produção de até 10 ton/ha/ano (Novaretti, 1985).

O controle microbiano de *H. tenuis* com fungos entomopatogênicos vem sendo estudado no Laboratório de Patologia de Insetos, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP (Almeida et al., 1997; Almeida & Alves, 1996; Moino Júnior, 1998).

Os hábitos comportamentais peculiares dos cupins, como trofalaxia, lambimento, tigmotropismo e canibalismo podem contribuir para o estabelecimento de epizootias nas colônias, facilitando a disseminação de fungos entomopatogênicos, embora os mesmos hábitos sejam relevantes na defesa do inseto contra o estabelecimento do agente patogênico (Almeida & Alves, 1996; Boucias et al., 1996; Moino Júnior, 1998).

Moino Júnior (1998) determinou que doses subletais de imidacloprid alteraram o comportamento natural dos cupins que, normalmente, tendem a eliminar os conídios do fungo entomopatogênico. Aliado ao entomopatógeno,

esse produto pode agir de forma sinérgica, permitindo que uma maior quantidade de conídios possa germinar e iniciar o processo de doença.

O controle de *H. tenuis* vem sendo visado em estudos baseados na utilização de iscas de papelão corrugado contendo produtos químicos ou isolados de fungos entomopatogênicos, associados ou não aos produtos químicos (Almeida et al., 1998; Almeida & Alves, 1996; Alves et al., 1995; Macedo et al., 1997; Moino Júnior, 1998)

No Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, no setor de Plantas Inseticidas, vem sendo desenvolvida uma linha de pesquisa com extratos vegetais de plantas, para o controle de várias espécies de insetos (Brunherotto & Vendramim, 2001; Rodríguez & Vendramim, 1997; Roel et al., 2000; Souza & Vendramim, 2000; Torrecillas & Vendramim, 2001; Vendramim & Scampini, 1997; Vendramim & Thomazini, 2001).

Apesar da escassa literatura existente sobre o emprego de extratos vegetais para insetos subterrâneos em geral, e cupins em particular, a utilização desses extratos isoladamente ou em associação aos fungos entomopatogênicos é uma alternativa interessante a se estudar. Uma vez que a ação do tóxico deve manifestar-se na colônia, o produto utilizado na isca não deve apresentar alta toxicidade inicial para o inseto, e sim agir depois na colônia ou modificar seus hábitos naturais de proteção contra os agentes de controle microbiano. Os extratos vegetais, que freqüentemente são citados como de ação lenta, poderiam, em concentrações adequadas, produzir estes efeitos desejáveis.

Assim, os objetivos propostos no presente estudo são: avaliar extratos de diferentes partes de três espécies de meliáceas, visando identificar efeitos negativos sobre *H. tenuis*; estudar a compatibilidade dos extratos selecionados com isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, de comprovada virulência, em condições de laboratório; e avaliar o efeito de extratos vegetais e fungos entomopatogênicos no comportamento e controle de *H. tenuis*, em condições de laboratório e campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência e controle de *Heterotermes tenuis*

Dentre as mais de 2700 espécies de cupins conhecidas no mundo, apenas uma minoria atinge importância econômica. Entretanto, os cupins subterrâneos, por apresentarem colônias protegidas no solo e difíceis de localizar, são pouco atacadas por predadores e patógenos, dificultando-se, adicionalmente, o sucesso das medidas de controle (Culliney & Grace, 2000).

O conhecimento básico da diversidade e biologia dos cupins é requerimento necessário para o manejo adequado dos problemas causados por cupins (Logan et al., 1990).

A família Rhinotermitidae inclui alguns gêneros largamente distribuídos e que freqüentemente causam danos de importância econômica. Os gêneros *Reticulitermes* e *Coptotermes*, amplamente estudados, incluem espécies que causam importantes danos em edificações (Logan et al., 1990). Outros gêneros da família contêm espécies de importância econômica em culturas e pastagens.

Os cupins subterrâneos constituem-se numa das mais sérias pragas da cultura canavieira, ocorrendo em todos os países onde se cultiva a cana-de-açúcar e tendo importância econômica na Ásia, Austrália, região do Caribe e América do Sul (Pizano, 1995). Segundo esse autor, no Brasil esta praga acha-se disseminada, ocasionando danos em cana-planta e soca. Assim, se na implantação de uma nova cultura não se utiliza um inseticida adequado no sulco de plantio, os cupins atacam os toletes recém-plantados, danificando as gemas e trazendo, como conseqüência, falhas na germinação. Em cana-soca,

não existe um método econômico e eficiente de controle, sendo os prejuízos, nestes casos, ainda maiores pela perda de peso e drástica redução na rebrota.

Em levantamentos realizados pelo IAA/PLANALSUCAR, em 1985, foram gastos aproximadamente 150 toneladas de princípio ativo de produtos clorados para o controle de cupins em áreas com cana-de-açúcar, que totalizaram mais de 250.000 hectares, pertencentes a 83 unidades produtoras, apenas no Estado de São Paulo (Pizano, 1995).

Pizano & Fontes (1986) afirmam que os levantamentos sistemáticos de cupins em áreas canavieiras do Estado de São Paulo revelam o gênero *Heterotermes* como um dos mais marcantes em relação aos ataques, tanto em frequência como em intensidade, em cana-de-açúcar. Esses autores indicam que, principalmente em solos arenosos, *Heterotermes tenuis* e *H. longiceps*, penetrando nos toletes e rizomas, são capazes de danificar a parte subterrânea e atingir a parte aérea da planta.

O gênero *Heterotermes* tem se mostrado o mais daninho na cultura de cana-de-açúcar, determinando a necessidade de controle químico em áreas com infestação acima de 30% dos pontos com presença de cupins (Pizano et al., 1990). Ainda segundo esses autores, a única oportunidade que o produtor tem para conter o ataques dos cupins subterrâneos é por ocasião da implantação da lavoura, tanto nas áreas de expansão como nas de reforma.

Os produtos mais eficientes para o controle de cupins subterrâneos têm como característica mais importante a capacidade de permanecer ativos no solo por longo período, daí a excelente performance dos cupinidas organoclorados. Depois da proibição de fabricação, comercialização e uso de organoclorados no país, houve um incremento nas pesquisas, destacando-se inicialmente o monitoramento das populações como o avanço mais significativo em termos de tecnologia de controle de cupins subterrâneos. Posteriormente, o desenvolvimento de novos produtos e o emprego de iscas artificiais vêm gradativamente substituindo os levantamentos convencionais, aumentando a

eficiência e a praticidade do controle e diminuindo os custos (Macedo et al., 1995).

Por outro lado, as pesquisas com controle microbiano têm produzido novas opções, como a utilização dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, que vem sendo estudada no Laboratório de Patologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

Dentre os novos cupinidas desenvolvidos, destacam-se o fipronil e o imidacloprid, que têm se revelado mais seguros para o ambiente do que os produtos anteriormente utilizados (Berti Filho, 1995).

Uma das estratégias de controle de cupins subterrâneos que vem sendo mais pesquisada é o uso de iscas atrativas, com inseticidas e/ou entomopatógenos. O emprego de inseticidas de ação lenta (*slow acting*) em armadilhas baseia-se na premissa que uma colônia inteira de cupim possa ser destruída com o tratamento de somente uma parte do sistema de galerias, ao ser o agente tóxico distribuído para toda a colônia pelas interações sociais (trofalaxia e lambimento) com os operários expostos por ocasião do forrageamento (Su et al., 1987).

Ainda, o sucesso da técnica de iscas tóxicas reduz drasticamente a quantidade de inseticida empregado, em comparação com as aplicações de solo (Su & Scheffrahn, 1991).

Produtos como hidrametilnon (Amdro; AC 217,300) possuem características apropriadas para o uso em iscas para o controle de cupins subterrâneos (Logan & Abood, 1990). O produto é tóxico e não repelente (para *Reticulitermes santonensis* e *Microtermes lepidus*) em uma série de concentrações e a ação tóxica se mantém quando o produto é transferido dos indivíduos contaminados para os não expostos através dos hábitos sociais de comportamento.

Os inibidores de síntese de quitina hexaflumuron e diflubenzuron (Su & Scheffrahn, 1993) são apropriados para seu emprego em iscas, visando ao

controle de cupins subterrâneos. Segundo Su (1994), aplicações de hexaflumuron em campo foram bem sucedidas em suprimir a atividade de forrageamento de duas espécies de cupins subterrâneos (*Coptotermes formosanus* e *R. flavipes*) na Flórida, e apenas uma pequena quantidade de ingrediente ativo foi necessária para reduzir a população de forrageadores em cerca de 80 a 90%.

Stansly et al. (2001) não detectaram nova atividade de cupins dois a três meses após a utilização de iscas com hexaflumuron (0,1 ou 0,5%) em áreas de monitoramento de *R. flavipes*, num pomar cítrico na Flórida.

Na busca de novas alternativas para o controle de cupins, outros compostos, como semioquímicos obtidos de formigas da subfamília Dolichoderinae, vêm sendo pesquisados (Cornelius & Grace, 1994). A secreção da glândula anal dessas formigas contém terpenóides com ação inseticida, segundo Cornelius et al. (1995). Esses autores verificaram que a aplicação direta do extracto do corpo inteiro de *Ochetellus glaber* (Dolichoderinae) provocou mortalidade significativa de *C. formosanus*. Adicionalmente, o extracto foi altamente repelente para os cupins, no mínimo por um período de um mês. Essa característica não é apropriada para o emprego dessas substâncias na estratégia com iscas atrativas.

Novos produtos cupinídeos, cujos ingredientes ativos apresentam características totalmente diferentes dos organoclorados e bastante seguros ao ambiente, já estão no mercado brasileiro, devidamente registrados para emprego na agricultura, como o isasofos (Miral) e o fipronil (Regent) (Macedo, 1995). O autor salienta que o emprego de iscas artificiais vem gradativamente substituindo, com maior eficiência, praticidade e menores custos, os levantamentos convencionais como arranquio de soqueiras ou plantio de mudas de cana como iscas.

Os fungos entomopatogênicos, pela potencialidade de desenvolver epizootias nas colônias dos cupins são considerados como uma alternativa apropriada para o controle de cupins subterrâneos, embora as pesquisas

existentes sejam, na grande maioria, realizadas em laboratório e faltem resultados de experimentos de campo (Culliney & Grace, 2000).

No Brasil, isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Almeida & Alves, 1996; Almeida et al., 1998; Alves et al., 1998) vêm sendo utilizados, associados ou não com inseticidas, em iscas de papelão corrugado (Termitrap®) para o controle de *H. tenuis* em cana-de-açúcar.

Com o método de iscas, gasta-se o mínimo de inseticidas e patógenos para eliminar uma grande quantidade de insetos que são atraídos pelas iscas (Alves & Almeida, 1995). Segundo esses autores, em experimentos de campo já se demonstrou que uma unidade da armadilha Termitrap® pode atrair até 15000 insetos, entre operários e soldados.

2.2 Efeito de extratos vegetais sobre cupins

De acordo com Stoll (1986), os inseticidas naturais obtidos de plantas são considerados como mais seguros para o homem, os animais domésticos e os insetos benéficos, e menos nocivos para o ambiente do que os inseticidas sintéticos.

Segundo Logan et al. (1990), grandes cuidados devem ser tomados na utilização destes inseticidas naturais, desde que normalmente não são submetidos aos exigentes testes requeridos para os inseticidas sintéticos comerciais. Porém, o autor estabelece que a pesquisa existente no uso de extratos de plantas para o controle de cupins sugere que eles podem ter um considerável potencial no fornecimento de um método barato de controle local.

Idealmente, os inseticidas vegetais devem provir de plantas locais ou de fácil incorporação e cultivo; preferentemente adaptadas a solos de baixo valor para não concorrer com culturas alimentícias; o ingrediente ativo deve ser facilmente extraído com pouca ou nula preparação; as plantas não podem tornar-se ervas daninhas ou hospedeiras de pragas de culturas e,

adicionalmente, devem apresentar baixa toxicidade para organismos benéficos e para o homem (Logan et al., 1990).

Esses autores indicam que muitos extratos de tecidos vegetais são reconhecidos como repelentes ou tóxicos para cupins, com base em testes de laboratório, embora poucos estudos tenham verificado sua efetividade em condições de campo.

Martius (1998) relata que, dentre as espécies vegetais citadas como possuidoras de repelência ou toxicidade para cupins, destacam-se algumas que crescem facilmente em áreas de baixo valor, como o mamão (*Carica papaya*) e a mamona (*Ricinus communis*). O autor salienta, ainda, que os extratos vegetais representam uma boa opção para repelir e controlar cupins, e que amplas pesquisas deveriam ser feitas no Brasil, onde o acervo fitofarmacológico ainda está pouco estudado.

Os inseticidas botânicos não devem ser considerados sempre como seguros. Entretanto, contrariamente aos inseticidas sintéticos, os compostos naturais são geralmente biodegradáveis e potencialmente mais seguros para o ambiente (Simmonds et al., 1992). Esses autores citam que muitas substâncias químicas das plantas com potencial inseticida são metabólitos secundários (aleloquímicos) e que o desenvolvimento atual das técnicas de isolamento e análise, em laboratório, tem levado à identificação de um grande número de compostos novos.

Segundo McChesney (1994), uma série de fatores convergentes, adicionais ao avanço nas técnicas de identificação estrutural das substâncias, estão influenciando o renovado interesse nas pesquisas e desenvolvimento de inseticidas naturais. Alguns deles são: avanços na tecnologia de bioensaios; avanços no conhecimento bioquímico e fisiológico; a revolução biotecnológica; o sucesso histórico da técnica; a perda de praticantes de medicina tradicional; a perda de diversidade biológica; a perda de diversidade química e a concorrência global [sic]. Grainge & Ahmed (1988), no seu catálogo de plantas com propriedades para o controle de pragas, apresentam uma lista de espécies

consideradas como as mais importantes devido ao seu amplo espectro, dentre as quais se encontram as meliáceas *Azadirachta indica* (comumente conhecida por nim ou nime) e *Melia azedarach*. Entretanto, apenas esta última é citada como apresentando efeito sobre cupins como categoria geral, e nenhuma meliácea é citada para o controle do cupim subterrâneo *R. flavipes*.

Na literatura internacional, porém, existem referências sobre a ação de produtos de origem vegetal, incluindo o nim e outras meliáceas, sobre certas espécies de cupins.

As sementes e folhas do nim contêm terpenóides com potente atividade inseticida. Os produtos derivados do nim têm demonstrado uma série de efeitos sobre os insetos incluindo repelência e deterrência alimentar, inibição do crescimento, supressão da reprodução, interrupção de acasalamento e atividade ovicida. Um dos terpenóides mais ativos nas sementes do nim é a azadiractina, que age como repelente de alimentação e inibe o crescimento de um grande número de insetos, em níveis de microgramas (Simmonds et al., 1992). Ainda segundo esses autores, nas folhas os terpenóides ativos incluem nimbina, deacetilnimbina e tionemona.

As meliáceas *M. azedarach* e *M. toosendan* contêm o deterrente alimentar toosendanina. Entretanto, a toxicidade e a deterrência alimentar associada com os extratos dessas plantas não está correlacionada com os níveis de toosendanina dos extratos (Simmonds et al., 1992). Os autores sugerem que a toosendanina não é o composto mais ativo destas espécies ou então interage com outra(s) substância(s) presente(s) nos extratos. Como exemplo, *M. azedarach* contém outros limonóides denominados meliatoxinas, deterrentes para alimentação de *Spodoptera litura*, estruturalmente semelhantes às triquilinas presentes nas espécies da meliácea *Trichilia*.

Warthen Junior (1979) relatou a atividade inibitória da alimentação de insetos para certos componentes do nim, sugerindo o seu possível uso contra diversos insetos, incluídos os cupins. Ishida et al. (1992) purificaram um extrato

metanólico de óleo de nim com atividade inibitória da alimentação de cupins, isolando 11 compostos limonóides de potência variável para a inibição.

Sharma et al. (1990) estudaram o controle de cupins que danificam a madeira de *Mangifera indica* e *Pinus longifolia* e determinaram maior atividade inseticida do óleo e extratos de folha de mamona que do óleo ou folhas de *A. indica*, porém menor do que a atividade dos inseticidas DDT e BHC.

Mokabel & Gowda (2000) também verificaram reduções de danos de cupins em iscas de bambu tratadas com extratos de nim (72-88%) e *R. communis* (71-79%). Entretanto, a maior redução dos danos (92-95%) foi verificada nas iscas tratadas com extratos de *Pongamia pinnata*.

O óleo de nim agiu como deterrente de alimentação de *Reticulitermes speratus* em testes sem chance de escolha (Serit et al., 1992a). Neste trabalho um extrato metanólico foi quatro vezes mais ativo que o óleo de nim completo. Onze compostos limonóides responsáveis por 81,5% da atividade foram extraídos por cromatografia do extrato metanólico, mas não foi determinada a toxicidade aguda para o inseto. Não foi detectada toxicidade aguda nos extratos avaliados, embora tenha ocorrido 100% de mortalidade em um período de 30 dias, em alguns tratamentos, devido à não-alimentação. Os autores indicaram que vários extratos ativos tinham níveis muito baixos ou nulos de azadiractina, sugerindo que a inibição de alimentação foi causada por alguns dos outros limonóides identificados.

Parihar (1994) para avaliar a eficácia de controle de cupins comparou os seguintes tratamentos: folhas de *Calotropis procera*, sementes de *A. indica*, azadiractina, diazinon, clorpirifós e endosulfan. Concluiu que todos os tratamentos controlaram a infestação e atingiram controle efetivo de *Microtermes* spp. atacando árvores e *Odontotermes* spp. infestando culturas.

Os limonóides obacunona e nomilina, extraídos das sementes de *Citrus natsudaïdai*, foram altamente deterrentes de alimentação para *R. speratus*, enquanto a limonina e a azadiractina não apresentaram essa atividade.

Nenhum dos quatro limonóides apresentou toxicidade aguda para essa espécie de cupim (Serit et al., 1992b).

Hanif et al. (1988) encontraram propriedades negativas para os cupins em várias espécies vegetais, dentre as quais incluiu-se *M. azedarach*. Lin & Wang (1988) determinaram valores de mortalidade de *C. formosanus* e *Odontotermes formosanus* entre 65 e 100%, quando alimentados com pó de diferentes estruturas da referida planta.

Outros compostos de origem vegetal têm demonstrado atividade inibitória da alimentação de *R. speratus*, como os extratos de *Ocotea foetens* e *Laurus azorica* (González-Coloma et al., 1994), o extrato metanólico de *Phellodendron amurense* (Kawaguchi et al., 1989), extratos metanólicos e hexânicos de *P. chinense* (Su et al., 1990), extratos metanólicos de *Detarium microcarpum* e hexânicos de *Xylopiia aethiopica* (Lajide et al., 1995 a; b), extratos hexânicos e metanólicos de sementes de *Aframomum melegueta* (Escoubas et al., 1995) e extratos orgânicos de seis madeiras duras brasileiras (Jones et al., 1983).

Blocos de madeira tratados com uma mistura de resina e borracha extraídas de *Parthenium argentatum* não apresentaram danos de cupins por períodos de 71 e 67 meses numa floresta úmida de Panamá e no deserto de Arizona, respectivamente, sendo que as armadilhas sem tratamento foram rotineiramente destruídas por espécies de *Heterotermes* e *Coptotermes* no Panamá, e de *Heterotermes* e *Reticulitermes* no Arizona (Bultman et al., 1998).

A menor sobrevivência de cupins foi determinada em testes com madeira, pó de serragem ou extratos de madeira de várias espécies de árvores (Akhtar & Raja, 1985; Grace et al., 1989; Lemaire et al., 1986; Scheffrahn et al., 1988).

Nagnan & Clement (1990) determinaram a ação tóxica de terpenos produzidos por *Pinus pinaster* sobre *Reticulitermes* spp., com LD₅₀ entre 3 e 20 µg/mg.

Em testes conduzidos com *R. flavipes*, *R. virginicus* e *C. formosanus* o álcool sesquiterpeno *widdrol* foi determinado como o componente de maior toxicidade de um extrato de *Juniperus virginiana* (McDaniel et al., 1989).

Propriedades inseticidas foram também determinadas para o gama-gurjunenol, extraído das resinas de *Dipterocarpus kerrii*, que provocou 50% de mortalidade de *Neotermes dalbergiae* em 7 dias (Richardson et al., 1991) e para outros compostos isolados de resinas cruas de *D. retusus*, *D. intricatus*, *D. haseltii* e *D. grandiflorus* (Messer et al., 1990).

Hutchins (1997) relatou a toxicidade do extrato da madeira de *Aleurites fordii*, que provocou mortalidade total em *R. flavipes*, num período de 48 horas.

Para *C. formosanus*, foi determinada atividade inseticida do brugierol e do isobrugierol, duas substâncias do extrato em clorofórmio de *Bruguiera gymnorhiza* (Yaga et al., 1991), extratos de *Ajuga nipponensis* (Huang et al., 1990) e derivados do diidro-5,6-deidrocaawaina, isolado das folhas de *Alpinia speciosa* (Tawata et al., 1996).

Trabalhando com artrópodos-pragas agrícolas, de armazenamento e de importância médica, Ahn et al. (1998) determinaram ação inseticida e acaricida do composto cavarcol, obtido do pó-de-serragem de *Thujopsis dolabrata*. Nesse trabalho, outro componente, a beta-tujaplicina, mostrou leve atividade inseticida sobre cupins.

A impregnação da madeira de espécies suscetíveis a cupins com o látex de *Calotropis procera* reduziu o ataque destes em níveis semelhantes aos obtidos com controle químico (10,6 a 11,9% e 8,2 a 10,9% de perda em peso, respectivamente) (Giridhar et al., 1988).

Steller & Labosky (1984) determinaram a mortalidade completa de cupins, quatro semanas após a aplicação de extratos de *Quercus prinus*, *Pinus strobus*, *Carya ovata* e *Sassafras albidum* em blocos de celulose. Apesar de atingir mortalidade total, os cupins consumiram maior quantidade de celulose tratada com extratos de casca do que com preservativos comerciais, tendo-se detectado, em adição, efeito de atração por parte dos tratamentos com extratos de *C. ovata* e *Juglans nigra*.

Na Nigéria, Umeh & Ivbijaro (1999) verificaram menor dano de três espécies de cupins da família Termitidae e maiores rendimentos de milho, em

campos de agricultores, em tratamentos de solo com extratos aquosos de sementes de nim e óleo de sementes de *Piper guineense*. Os autores indicaram o potencial desses extratos de espécies vegetais locais como medida barata de controle de cupins e sua importância para os pequenos agricultores de países em desenvolvimento.

A ausência de efeito tóxico instantâneo (*knockdown*) é uma característica dos extratos vegetais considerada como negativa pelos agricultores acostumados ao uso de inseticidas sintéticos (Schmutterer, 1997). Entretanto, esse fato torna-se favorável quando o produto é utilizado em iscas atrativas para o controle de cupins.

Em testes comportamentais, *R. flavipes* mostrou preferência de forrageamento, com respostas positivas de orientação, para a maioria dos extratos de *Aesculus hippocastanum*. Contrariamente, a maioria dos extratos de *Ailanthus altissima* provocaram respostas negativas (Grace, 1997).

Grace & Yates (1992), avaliando a preferência para alimentação de *C. formosanus* com óleo de nim e a formulação comercial de nim Margosan-O, determinaram, em testes rápidos, que não houve repelência inicial dos tratamentos contendo até 1000 ppm de azadiractina, embora o tratamento de 100 ppm tenha causado mortalidade significativa. Entretanto, em testes mais demorados, com chance de escolha, os operários dessa espécie se alimentaram significativamente menos nos papéis tratados com ≥ 100 ppm de azadiractina.

2.3 Efeito de extratos vegetais sobre entomopatógenos

Os cupins têm sido considerados insetos de interesse para o controle microbiano pelo fato de viverem agregados e em alta densidade populacional em ambiente favorável (úmido), embora sejam conhecidos poucos casos de controle biológico bem sucedidos, devido aos hábitos de comportamento do

inseto, principalmente o isolamento dos membros infectados da colônia e o lambimento do corpo (*grooming*), o que dificulta a disseminação do patógeno (Logan et al., 1990).

O desenvolvimento de agentes de controle microbiano bem sucedidos depende, entre outros fatores, de sua compatibilidade com outros agentes de controle utilizados nas lavouras, já que os fungicidas, herbicidas e inseticidas podem afetar a viabilidade dos fungos entomopatogênicos (Clark et al., 1982).

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Esses produtos podem atuar inibindo o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação dos microrganismos, e até causar mutações genéticas neles, fatores que podem levar à diminuição da virulência à determinada praga (Alves et al., 1998).

Segundo Pereira et al. (1998), os estudos de compatibilidade de entomopatógenos e produtos químicos são geralmente realizados em laboratório. Segundo esses autores, na maioria dos casos, tanto a molécula do princípio ativo do agrotóxico como os materiais utilizados na formulação dos produtos químicos têm efeito negativo sobre os microrganismos. Assim, deve-se tomar cuidado ao misturar produtos químicos com agentes microbianos.

Hall & Dunn (1959) avaliaram o efeito de vários fungicidas e inseticidas usados para o controle do pulgão *Terioaphis maculata*, sobre diversas espécies do fungo *Entomophthora*. A maioria dos produtos afetou o crescimento dos fungos ou a germinação dos conídios. Entretanto, houve diferenças de acordo com o tipo de produto e com a espécie do entomopatógeno.

Segundo Pung et al. (1993), os inseticidas clorpirifós e fenitrotion não afetaram o número de colônias do isolado DAT F-001 de *M. anisopliae*, mas o crescimento do fungo foi reduzido pelo clorpirifós em dez vezes a concentração padrão de aplicação e inibido pelo fenitrotion na concentração de 1/5 do padrão de aplicação. Ainda segundo esses autores, a germinação dos conídios do *M. anisopliae* DAT F-001 foi severamente inibida pelo fenitrotion nas

concentrações 500 e 1000 ppm, enquanto a germinação dos conídios de *M. anisopliae* DAT-268 e *B. bassiana* DAT F-049 foi inibida na concentração de 200 ppm e maiores desse inseticida.

Neves et al. (2001) avaliaram *in vitro* o efeito fungitóxico de três inseticidas neonicotinóides (acetamiprid, imidacloprid e thiamethoxan) sobre *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* sp. Os autores concluíram que os inseticidas mostraram, na maioria dos casos, compatibilidade com os entomopatógenos e sugeriram que podem ser recomendados em programas de MIP, nas concentrações e formulações avaliadas, para o controle de pragas que tenham como inimigos naturais os fungos testados.

Clark et al. (1982) avaliaram o efeito de fungicidas e inseticidas sobre *B. bassiana*, em laboratório e campo, e observaram diferenças entre produtos, sendo que um fungicida experimental e o inseticida permetrina foram os mais compatíveis com o entomopatógeno.

Adicionalmente, em baixas concentrações, algumas combinações de inseticidas e entomopatógenos podem incrementar o controle das pragas. A ação estressora de certos compostos pode afetar a resistência comportamental observada naturalmente nos cupins, pelos seus hábitos de limpeza. O produto pode agir de forma sinérgica, permitindo que uma maior quantidade de conídios possa germinar e iniciar o processo de doença, como constatado por Moino Júnior (1998) para imidacloprid e *B. bassiana* e *M. anisopliae*, em testes com *H. tenuis*. O autor concluiu que os produtos imidacloprid e fipronil são compatíveis com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, sendo este menos suscetível aos produtos testados que o primeiro. O autor observou que o imidacloprid em concentrações subletais alterou o comportamento de limpeza dos operários de *H. tenuis* enquanto que o fipronil não provocou alteração desse mecanismo de proteção contra a ação dos entomopatógenos.

A suscetibilidade dos insetos aos fungos entomopatogênicos pode ser afetada pelo alimento que ingerem, como foi demonstrado em testes de laboratório e casa de vegetação para *Leptinotarsa decemlineata* criada em

diferentes hospedeiros vegetais e inoculados com *B. bassiana* (Hare & Andreadis, 1983). A mortalidade de pré-pupas de *L. decemlineata*, atribuída a *B. bassiana*, foi significativamente menor quando as larvas foram criadas com *Lycopersicon esculentum*, seguido das larvas criadas com *Solanum dulcamara*, *S. tuberosum* e *S. carolinense*.

Resultados semelhantes foram encontrados em relação à suscetibilidade de *Blissus leucopterus leucopterus* a *B. bassiana*, quando o inseto foi criado em diferentes hospedeiros, dieta líquida e água (Ramoska & Todd, 1985), e para a suscetibilidade de *Diatraea saccharalis*, criada em diferentes tipos de alimento, aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Alves et al., 1990).

Contrariamente, Costa & Gaugler (1989) determinaram que hospedeiros vegetais com diferentes teores de glicoalcalóides totais não afetaram a suscetibilidade de *L. decemlineata* à infecção por *B. bassiana*. Entretanto, os autores sugeriram que a aplicação tópica dos conídios do entomopatógeno pode ter minimizado qualquer influência negativa direta dos glicoalcalóides sobre o fungo, que pode se manifestar quando a contaminação dos insetos ocorre por via oral.

A compatibilidade de vários fungos entomopatogênicos com diversos inseticidas vegetais visando ao controle de algumas espécies de insetos e outros artrópodos tem sido avaliada em alguns trabalhos, embora seja praticamente inexistente essa informação para cupins.

Aguda et al., (1986) verificaram, em laboratório, efeitos negativos do óleo de nim em concentração de 5% ou maiores, sobre a produção de conídios de *M. anisopliae*. Os autores indicaram, entretanto, que deve ser considerado que as concentrações em que o óleo de nim é aplicado em casa de vegetação ou campo variam de 0,5 a 2%.

Stathers et al. (1993) estudaram o efeito de vários óleos de origem vegetal no armazenamento de conídios de *M. flavoviridae*, e encontraram que com exceção do óleo de soja, todos os óleos vegetais avaliados reduziram a viabilidade dos conídios para menos de 40%, após quatro semanas.

Vega et al. (1997) verificaram, *in vitro*, o efeito negativo de compostos secundários vegetais sobre a germinação dos blastosporos de *Paecilomyces fumosoroseus*, concluindo que a presença de aleloquímicos em um substrato (cutícula dos insetos ou folhas) pode significar um impedimento para a sobrevivência dos fungos entomopatogênicos.

Devi & Prasad (1996) determinaram a compatibilidade de *Nomuraea rileyi* com extratos de semente de *A. indica*, *M. azadarach* e *Pongamia pinnata*; extratos de planta inteira de *Tephrosia purpurea*, *Parthenium hysterophorus* e *Cleome viscosa*; e vários óleos vegetais, sendo que nenhum dos compostos testados provocou efeito negativo sobre o fungo.

Para o controle de *Hypothenemus hampei* em cafeeiro, Rodríguez et al. (1997) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de sementes de nim em compatibilidade com *B. bassiana*. As concentrações de 0,5; 1,5 e 2,5% do extrato foram compatíveis com o entomopatógeno, não afetando significativamente a porcentagem de germinação dos conídios. O crescimento do micélio do entomopatógeno não foi afetado com concentrações de até 5,0% do extrato vegetal.

Hirose et al.¹ avaliaram o efeito do óleo de nim (2%) sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*, e determinaram menor diâmetro das colônias e inibição da conidiogênese e da germinação dos conídios de ambos os isolados testados. O isolado CG 252 de *B. bassiana* foi comparativamente mais afetado que o isolado CB 38 de *M. anisopliae*.

¹ HIROSE, E.; NEVES, P.M. O.J.; ZEQUI, J.A.C.; MARTINS, L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO JR., A. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Em elaboração)

2.4 Efeito associado de inseticidas e fungos entomopatogênicos sobre cupins

De acordo com Logan et al. (1990), o controle biológico de cupins tem recebido pouca atenção e não tem sido geralmente bem sucedido. Os autores sugerem que o manejo de predadores, locais o introduzidos, será pouco efetivo se apenas operários forrageadores são mortos, desde que a possibilidade de contar com predadores que ataquem o rei e a rainha parece remota. Muitos microrganismos são patogênicos para cupins, entretanto, poucos têm sido bem estudados. Isso, combinado com os mecanismos sociais dos cupins para combater as infecções dentro das colônias, indica que o controle biológico bem sucedido e largamente utilizado ainda está longe de ser uma realidade.

Entretanto, os fungos entomopatogênicos, no seu papel como patógenos obrigatórios de artrópodos, produzem inseticidas potentes que paralizam ou matam seus hospedeiros, e bactericidas ou fungicidas que preservam o cadáver de competidores saprofíticos (Simmonds et al., 1992).

Os fungos pertencentes à ordem Moniliales, onde se encontram os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Paecilomyces*, são o principal alvo dos estudos em laboratório e testes de campo (Moino Júnior, 1998). Porém, segundo Culliney & Grace (2000), apenas *B. bassiana* e *M. anisopliae* têm sido extensivamente estudados para o controle de cupins. Nos numerosos estudos realizados com estes entomopatógenos, os resultados têm sido variáveis em função da espécie de cupim, dos isolados dos entomopatógenos e da concentração do inóculo e a forma de introduzi-los em contato com as populações de cupins.

Khan et al. (1992) avaliaram a patogenicidade de oito fungos para *Odontotermes wallonensis*, determinando que *B. bassiana*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. flavoviridae* var. *minus*, *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* foram patogênicos, enquanto *Verticillium lecanii*, *P. farinosus* e *Nomuraea rileyi*

não foram virulentos. Dentre os patogênicos, *B. bassiana* foi o mais eficiente, seguido de *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, *P. lilacinus* e *P. fumosoroseus*.

Segundo Hall (1994), qualquer agente de controle microbiano deve ser capaz de contornar o problema da resistência comportamental dos cupins e ser eficientemente transmitido por trofalaxia ou outros meios, além de se mostrar seguro ao ambiente. O comportamento da passagem dos microrganismos simbioses nos cupins através da alimentação proctodéica (trofalaxia) é a base de tentativas de introdução de agentes químicos ou microbianos numa colônia. A resistência comportamental à transmissão dos fungos, promovida por indivíduos sadios, foi demonstrada em alguns estudos, e, além disso, a conidiogênese de alguns fungos é inibida no escuro, podendo diminuir a eficácia do controle.

A incidência de fatores negativos para a germinação de conídios de entomopatógenos em condições de campo e sua incidência na limitação do uso de microrganismos para o controle de cupins foi discutida por Hänel & Watson (1983). Um dos fatores que explicam a falta de sucesso do controle microbiano de cupins é o hábito de muitas espécies isolarem os indivíduos mortos ou contaminados, na colônia, diminuindo dessa forma sua capacidade de se espalhar e atingir toda a população (Pearce, 1987). Logan et al. (1990) sugerem a probabilidade de que outros microrganismos presentes na colônia ou que os cupins *per se* produzam secreções fungistáticas.

Entretanto, de acordo com Kramm et al. (1982), pelo menos três mecanismos comportamentais comuns em cupins podem disseminar os patógenos entre indivíduos: a trofalaxia, a limpeza do corpo dos operários do ninho e o canibalismo, que regula a proporção de indivíduos de cada casta e recicla os nutrientes nitrogenados.

O governo do Quênia, em conjunto com a *Danish aid* (DANIDA) começou um projeto cujo principal objetivo é o desenvolvimento de um programa de manejo integrado de pragas para África, onde o controle biológico e, em particular o uso de inseticidas microbianos tem sido priorizado (Ochiel et al.,

1997). Segundo esses autores, *M. anisopliae* tem-se mostrado efetivo para a erradicação de cupins arborícolas e de montículo, e os levantamentos de entomopatógenos estão sendo orientados para a identificação e seleção de isolados nativos visando à utilização como agentes de controle biológico de cupins.

Delate et al. (1995) simularam em laboratório o uso de entomopatógenos em iscas para o controle de *C. formosanus*. Os cupins não evitaram o contato com as iscas contendo o fungo e se alimentaram do papel de filtro tratado com as suspensões de conídios. Os autores determinaram que a exposição dos cupins aos isolados 346 e 2162 de *M. anisopliae* causou rápida mortalidade, enquanto que a mortalidade provocada pelos isolados de *B. bassiana* foi mais lenta, porém aumentou gradativamente.

No Brasil, os primeiros estudos com a utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de cupins foram realizados por Fernandes & Alves (1991), que conduziram trabalhos de campo para o controle de *Cornitermes cumulans* com isolados de *M. anisopliae* selecionados em bioensaios de laboratório, e posteriormente com isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* (Fernandes & Alves, 1992; Alves et al., 1995).

Almeida (1994) estudou, em condições de laboratório, a potencialidade dos fungos *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *M. anisopliae* para o controle de *H. tenuis*, testando respectivamente 134, 8 e 2 isolados das espécies citadas. Dentre eles o isolado 634 de *B. bassiana* causou 90% de mortalidade em *H. tenuis* e apresentou boa esporulação em diversos meios de cultura e sobre o inseto-teste. Adicionalmente, o autor verificou a transmissão do fungo para indivíduos sadios da população do cupim.

Em estudos de campo, Alves et al. (1995) determinaram boa eficiência de controle de cupinzeiros pequenos de *C. cumulans* em avaliações feitas 100 dias após a aplicação de *B. bassiana* (isolado 868) e *M. anisopliae* (isolado 865) na concentração de três gramas de conídios puros por cupinzeiro. Os autores concluíram que para atingir controle em cupinzeiros médios e grandes há

necessidade do desenvolvimento de uma tecnologia de aplicação mais adequada.

Moino Júnior (1998) estudou os fatores que afetam a eficiência de controle de *H. tenuis* com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e determinou uma maior rapidez na mortalidade do cupim com o isolado E-9 de *M. anisopliae*, devido a um adiantamento das fases de penetração, colonização e conidiogênese, com relação ao isolado 634 de *B. bassiana*. Adicionalmente, o autor determinou que microrganismos do solo, em particular *Trichoderma* sp., reduziram a eficiência dos fungos.

Contrariamente, a capacidade estressora de alguns produtos fitossanitários sobre os cupins, favorece a utilização do controle associado, atuando em mecanismos comportamentais, como no caso dos cupins (Moino Júnior, 1998).

O uso combinado de atrativos (iscas) com patógenos para intensificar o contato da praga com as toxinas, e garantir o efeito de controle usando várias toxinas é recomendado por alguns autores, segundo Martius (1998).

Alves & Almeida (1995) afirmam que na estratégia de iscas contendo inseticidas e entomopatógenos os insetos são mortos ou estressados pelo inseticida, tornando-se mais sensíveis ao fungo. Adicionalmente, crescendo sobre os insetos mortos, as estruturas reprodutivas do fungo representam uma fonte de inóculo para o controle de outros cupins existentes na área.

A estratégia de controle de *H. tenuis* por meio de iscas de papelão corrugado impregnadas com inseticidas e fungos entomopatogênicos deve considerar os possíveis efeitos fungitóxicos desses produtos fitossanitários a serem utilizados (Moino Júnior, 1998).

Zeck (1992) apontou a ocorrência de sinergismo entre o inseticida fipronil e o fungo *M. anisopliae* no controle de *R. flavipes*, observando que a associação entre ambos possibilitou o emprego de concentrações menores de conídios e do inseticida, com resultados de controle semelhantes aos obtidos com a utilização de quantidades maiores dos princípios ativos isoladamente. O

autor explicou o efeito com base na ação do imidacloprid como estressor para os cupins em doses subletais, afetando seus mecanismos de defesa, de modo a facilitar a ação do entomopatógeno.

Boucias et al. (1996) observaram que a aplicação de doses subletais de imidacloprid associadas a *B. bassiana* para o controle de *R. flavipes* não provocou alterações na cutícula nem no sistema imunológico do inseto, e sim no seu comportamento de limpeza, possibilitando a germinação e penetração de um maior número de conídios nos insetos e causando a morte mais rapidamente.

Ramakrishnan et al. (1999), em experimentos conduzidos em laboratório em solo estéril e não esterilizado, determinaram que a combinação de *M. anisopliae* e imidacloprid provocou maior mortalidade de *R. flavipes* que ambos agentes isoladamente, explicando que o inseticida provocou uma suscetibilidade maior dos cupins ao entomopatógeno.

Utilizando o isolado 634 de *B. bassiana* e imidacloprid em iscas atrativas para *H. tenuis*, em laboratório, Almeida & Alves (1996) determinaram que o tratamento fungo mais inseticida e o tratamento somente fungo causaram uma mortalidade de cerca de 70%, enquanto no tratamento somente imidacloprid, na concentração de 0,01%, a mortalidade apenas atingiu 3,1%. Os autores indicaram que quando foi associado micélio seco do fungo com o imidacloprid constatou-se um pequeno efeito sinérgico.

Almeida (1998) determinou que o inseticida fipronil pode ser associado com o fungo *B. bassiana* nas formulações de conídio puro, pasta de arroz e micélio seco, impregnados em armadilhas de papelão especialmente selecionadas para essa finalidade. O autor verificou que o fungo não foi repelente para *H. tenuis* e que pode ser usado em associação também com o inseticida imidacloprid em iscas de papelão.

Em condições de campo, Almeida et al. (1998) verificaram que o emprego de iscas com o isolado 634 de *B. bassiana* associado aos inseticidas imidacloprid e WG foi mais eficiente em reduzir as populações de *H. tenuis* em

cana-de-açúcar que o entomopatógeno isoladamente. Os autores sugerem que a técnica de iscas Termitrap com inseticidas associados ao fungo *B. bassiana* pode tornar viável a utilização de entomopatógenos no controle de cupins subterrâneos, contribuindo a diminuir o risco de intoxicação das pessoas e a poluição ambiental.

Neves & Alves (1999) verificaram a ocorrência de sinergismo entre os entomopatógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana* e o inseticida imidacloprid em testes de campo para o controle de *C. cumulans*. A associação permitiu reduzir a concentração de conídios dos fungos em até quatro vezes e a do inseticida em até 157 vezes, em relação às concentrações usualmente recomendadas, atingindo elevados níveis de controle dos ninhos grandes ($\geq 80\%$), com uma diminuição considerável do custo de controle. Os autores salientam os benefícios econômicos e ecológicos desse controle associado, sugerindo sua consideração como uma alternativa importante para a eliminação de colônias de *C. cumulans*.

Na literatura são escasas as referências de associação de extratos vegetais com entomopatógenos e praticamente inexistentes para o caso de fungos entomopatogênicos e cupins. Em alguns trabalhos, entretanto, foi avaliado o efeito conjunto da associação de extratos com vírus, fungos ou bactérias para o controle de outros organismos pragas.

Nagesh & Reddy (1995) estudaram a combinação de fungos entomopatogênicos com extratos de nim e *Ricinus communis* para o controle do nematóide *Meloidogyne incognita*, determinando que a associação com extrato de folha de nim melhorou a ação de *Verticillium lecanii* mais do que a de *P. lilacinus*.

Shapiro et al. (1994) verificaram que o extrato de sementes de nim, nas concentrações de 0,1 a 1,0%, não afetaram o vírus da poliedrose nuclear de *Lymantria dispar*, e que as lagartas expostas à associação do vírus com o extrato morreram mais rapidamente que as expostas apenas ao vírus. Os autores sugerem que o uso do nim como aditivo ao VPN de *L. dispar* é uma

técnica promissora porque o consumo das lagartas e a defoliação podem ser reduzidas sem interferência na atividade do patógeno.

Sarode et al. (1995) verificaram resultados positivos da associação do extrato de semente de nim com o vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis*, para o controle de *Pectiniphora gossypiella* em algodoeiro. O extrato e o vírus, separadamente, foram menos eficientes que a associação de ambos, tanto na concentração recomendada (500 lagartas-equivalentes/ha de vírus e extrato a 6%) como na metade da mesma (250 lagartas-equivalentes/ha e vírus e extrato a 3%).

Trisyono & Whalon (1999) verificaram efeitos aditivo e sinérgico da associação da formulação Neemix (à base de nim) com dois isolados de *Bacillus thuringiensis*, sobre a mortalidade larval de *L. decemlineata*. Os autores sugeriram, ainda, que a associação do nim com o *B. thuringiensis* pode ser útil para retardar a capacidade de adaptação dessa praga aos mecanismos de ação desses produtos, quando aplicados sobre populações suscetíveis a ambos.

3 TOXICIDADE E REPELÊNCIA DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS PARA *Heterotermes tenuis*.

Resumo

A bioatividade de derivados de meliáceas em relação a *Heterotermes tenuis* foi estudada em laboratório. Foi avaliado o efeito de extratos aquosos de diversas estruturas de *Melia azedarach*, *Trichilia pallida* e *Azadirachata indica* (nim) (1 e 5% p/v), bem como o óleo de nim (1 e 2% v/v) e a formulação comercial Nimkol[®] à base de folhas de nim (0,5 e 1% i.a.), na sobrevivência dos cupins. Derivados selecionados desse grupo foram incluídos em testes de repelência, com chance de escolha, em três tipos de recipientes, com e sem ágar (2%). Os produtos foram incorporados por imersão em discos de papelão, que foram oferecidos como alimento para os insetos. Aplicou-se o Índice de Preferência (I.P.) para caracterização dos derivados. Avaliou-se, também, a transmissão do Nimkol entre diferentes proporções de indivíduos tratados e não tratados. O Nimkol causou mortalidade significativa de *H. tenuis*, a partir do 3º dia de alimentação (1% i.a.). Não foi determinada atividade tóxica significativa para os demais derivados testados. Com exceção do extrato de folhas de nim (5%), os produtos não foram significativamente repelentes para *H. tenuis*, incluindo o inseticida utilizado como testemunha química (sulfluramida, 157 ppm). Não houve evidência de transmissão de ingredientes ativos dos insetos tratados com Nimkol para outros indivíduos.

Summary

The biological activity of by-products of Meliaceae in relation with *Heterotermes tenuis* was studied in the laboratory. The effect of aqueous extracts from diverse structures of *Melia azedarach*, *Trichilia pallida* and *Azadirachata indica* (neem) (1 and 5% w/v), neem oil (1 and 2 % v/v) and the commercial formula Nimkol[®], obtained from neem leaves (0.5 and 1% a.i), was measured on the survivability of termites. Repellency of selected by-products from that group was studied in choice tests, in three types of recipients, with and without agar (2%). The products were incorporated by immersion of paper disks, which were offered as food to the termites. The Preference Index (P.I.) was used for the characterization of by-products. The transmission of Nimkol between different proportions of treated and untreated individuals was also evaluated. Nimkol caused a significant mortality of *H. tenuis* after the third day of feeding (1% a.i.). No significant toxic activity was determined for the other by-products. With the exception of the extract of neem leaves, the products were not significant repellent for *H. tenuis*, including the insecticide used as a chemical check (sulfluramid, 157ppm). There was no evidence of transmission of active ingredients from insects treated with Nimkol to other individuals.

3.1 Introdução

Após a Portaria nº 329 do Ministério de Agricultura, que proibiu o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária no Brasil, eliminou-se uma das alternativas mais eficientes de controle de cupins subterrâneos, devido ao longo efeito residual desses produtos. Na busca de novas alternativas procuram-se produtos mais específicos e menos nocivos para o ambiente.

Os produtos com atividade inseticida, derivados de vegetais, são reconhecidos como apropriados para o uso no manejo integrado de pragas,

devido à menor agressão ao ambiente e, como no caso do nim, pela seletividade para uma série de organismos benéficos (Schmutterer, 1997). Entretanto, essas características favoráveis são parcialmente devidas à rápida decomposição desses produtos em condições de campo.

O emprego de agentes tóxicos em iscas atrativas, para o controle de cupins, é uma alternativa promissora, que vem sendo pesquisada em vários países (Almeida et al., 1998; Macedo et al. 1997; Su, 1994; Su & Scheffrahn, 1993).

Preferencialmente, os produtos empregados em iscas para o controle de cupins em ninhos subterrâneos deveriam, em adição ao efeito tóxico, ser de ação lenta, não repelentes e transmissíveis de uns indivíduos para outros.

Assim, os inseticidas de ação lenta (*slow-acting*) podem provocar a destruição de uma colônia inteira de cupim, com o tratamento de somente uma parte da comunidade, ao ser o agente tóxico distribuído para toda a colônia pelas interações sociais com os operários expostos por ocasião do forrageamento (Su et al., 1987).

Os extratos vegetais, em geral, não apresentam efeito tóxico instantâneo (*knockdown*), característica freqüentemente considerada como negativa pelos agricultores acostumados ao uso de inseticidas sintéticos (Schmutterer, 1997). Entretanto, essa característica é favorável para o emprego dos produtos em iscas atrativas para o controle de cupins, desde que o intuito é obter baixa mortalidade no local de forrageamento, e ação sobre a maior parte dos indivíduos dentro da colônia.

Segundo Logan et al. (1990), em estudos de laboratório têm sido encontrados numerosos materiais de origem vegetal tóxicos para cupins, embora poucos tenham sido estudados em condições de campo.

Neste trabalho, foram avaliados derivados de meliáceas em relação à sua toxicidade e repelência para *Heterotermes tenuis*, e a transmissão entre operários dessa espécie para a formulação Nimkol-L, à base de folhas de nim.

3.2 Material e métodos

3. 2.1 Toxicidade de derivados de meliáceas para *H. tenuis*

Os experimentos de avaliação da toxicidade de extratos e derivados de meliáceas foram desenvolvidos no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Foi testado o efeito de extratos aquosos de *Trichilla pallida* Swartz, *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss (nim), bem como o óleo de nim e uma formulação comercial à base de extrato aquoso de folhas de nim (Nimkol-F[®] nos dois primeiros testes e Nimkol-L[®] nos demais experimentos) sobre o comportamento e sobrevivência de *H. tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae).

Os insetos empregados nos bioensaios foram coletados num campo de produção de cana-de-açúcar, distante cerca de 20 km de Piracicaba, na direção sudoeste, que vem sendo monitorado com armadilhas do tipo Termitrap[®], desenvolvidas por Almeida & Alves (1995).

O material vegetal, constituído por folhas, ramos e sementes das espécies citadas, foi coletado do Parque da ESALQ. Para a preparação dos extratos aquosos, as folhas, ramos e sementes foram secos separadamente em estufa com circulação de ar (a 45°C, por 48-72 horas) e triturados com moinho de facas até a obtenção de um pó fino. Os pós foram armazenados em frascos hermeticamente fechados e devidamente identificados, até a preparação dos extratos.

Os extratos, na concentração de 1 ou 5% (p/v), foram preparados adicionando 10 ou 50 g de pó seco, respectivamente, em um litro de água destilada, com agitação manual até a completa homogeneização. As suspensões foram mantidas em repouso por um período de 24 horas, sendo então seguidamente filtradas para eliminar as partículas sólidas. As concentrações de óleo de nim e do Nimkol foram preparadas na base v/v.

A aplicação dos extratos e de água destilada (testemunha) foi realizada por imersão de discos de papelão de aproximadamente 5 cm de diâmetro. Após secagem ao ar, um conjunto de dois discos, constituindo uma parcela, foi individualizado em caixa plástica de 6 cm de diâmetro, com furos para trocas gasosas na tampa superior. Em cada parcela foram adicionados 24 operários e um ou dois soldados de *H. tenuis*. Após a aplicação, as caixas foram acondicionadas em bandejas metálicas, cobertas com plástico preto e mantidas em sala climatizada (temperatura: $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$; umidade relativa: $65\pm 15\%$ a $70\pm 10\%$, dependendo do teste e escotofase contínua). Para garantir condições adequadas de umidade no interior das caixas, adicionaram-se diariamente três a cinco gotas de água destilada em um chumaço de algodão. A sobrevivência dos operários foi avaliada diariamente, tendo sido eliminados os insetos mortos e anotadas observações sobre o comportamento dos sobreviventes. O período de avaliação do primeiro teste foi de 30 dias e nos demais experimentos, de seis ou sete dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p\leq 0,05$).

3.2.2 Repelência de *H. tenuis* para derivados de meliáceas

O emprego de iscas atrativas como estratégia de controle de cupins baseia-se no princípio da transmissão de agentes químicos ou microbianos diretamente para os insetos atraídos, visando atingir toda a colônia (Almeida et al., 1998). Assim, há necessidade de que os produtos utilizados nas iscas não sejam repelentes aos operários de *H. tenuis*.

Com base nos resultados dos testes de toxicidade e nas observações do comportamento dos insetos sobreviventes foram selecionados, para os testes de avaliação de repelência, os extratos aquosos de folhas e sementes de nim (5% p/v) e de frutos de *T. pallida* (5% p/v), o óleo de nim (2% v/v) e o Nimkol-L

(1% i.a. v/v). O Nimkol-L foi incluído por ter evidenciado níveis significativos de toxicidade sobre *H. tenuis*. O óleo de nim e os extratos aquosos de sementes de nim e de frutos de *T. pallida*, foram incluídos porque visualmente afetaram a morfologia e o comportamento dos cupins nos testes. Também foram avaliados o extrato aquoso de folhas de nim e o inseticida sulfluramida. Este produto sintético foi incluído como testemunha porque, teoricamente, tem maior probabilidade de ser repelente ao inseto, de acordo com Su & Scheffrahn (1991), que constataram mortalidade de *Coptotermes formosanus*, em concentrações maiores que 4 ppm, e repelência, em concentrações maiores que 10 ppm do referido produto.

Os testes com chance de escolha foram realizados em três tipos de recipientes: 1) Arenas constituídas por caixas plásticas (6 cm de diâmetro) conectadas por tubos plásticos (AR, Figura 1.a); 2) Placas plásticas de Petri (15 cm de diâmetro) com ágar 2% (PAG, Figura 1.b) (adaptado de Su et al., 1982) e 3) Placas plásticas de Petri (15 cm de diâmetro) (PP, Figura 1.c). No ágar contido nas placas (preparado em forno microondas) foram retirados, com vazador, cinco cilindros (um central, de 2,5 cm de diâmetro, e quatro laterais, de 1 cm de diâmetro) confeccionando uma arena para o estudo do padrão de confecção de galerias. A superfície superior do ágar foi suficientemente lisa de modo a não deixar espaço de ar entre ela e a tampa superior da placa, para evitar a saída dos cupins do ágar.

Em todos os casos, os insetos foram liberados no centro dos recipientes, contendo quatro discos de papelão, em arranjo eqüidistante, sendo dois deles tratados com o produto e dois com água destilada (testemunha). Dependendo do teste e do recipiente, foram utilizados números variáveis de repetições (três a nove), de insetos por recipiente (50 ou 60) e períodos de avaliação (quatro a 13).

Figura 1 - Recipientes utilizados para os testes e repelência de *Heterotermes tenuis* para derivados de melíáceas. a) Arenas (AR); b) Placas com ágar (PAG); c) Placas de Petri (PP).

Nos recipientes sem ágar (PP e AR), em cada período de avaliação, contou-se o número de cupins presentes em cada disco. Inicialmente contou-se o número de insetos presentes nos discos, com e sem produto, e fora deles. Posteriormente, para a comparação da proporção de insetos presentes nos discos com e sem produto, consideraram-se apenas os períodos de avaliação em que pelo menos 40% dos insetos estavam presentes nos discos.

Nas placas com ágar (PAG), foram desenhadas as galerias construídas e, no final da avaliação, obteve-se a imagem de cada placa, mediante uso de *scanner*. As imagens obtidas foram divididas em quatro quadrantes, nos quais foi observado se as galerias tinham sido seladas ou não e foi medido o comprimento total de galerias nos quadrantes correspondentes aos produtos e à testemunha. O comprimento das galerias foi medido ao final do teste (sexto ou sétimo dias de observação). Para tanto, mediu-se o comprimento (cm) das galerias construídas nos quadrantes da placa correspondentes aos discos testemunha e aos tratados com o produto.

Os produtos foram caracterizados aplicando-se o Índice de Preferência:

$$I.P. = \frac{\% IP - \% IT}{\% IP + \% IT};$$

onde:

IP = nº de insetos presentes nos discos com produto

IT = nº de insetos presentes nos discos testemunha

Os produtos compreendidos na variação de $\pm 10\%$ do I.P. para o teste foram considerados como neutros.

Assim, de acordo com o I.P., os produtos foram considerados:

repelente: $-1 < I.P. < -0,1$

neutro: $-0,1 < I.P. < +0,1$

atraente: $+0,1 < I.P. < +1$

Os recipientes foram mantidos em condições controladas ($27 \pm 2^\circ\text{C}$; $65 \pm 15\%$ U.R. e escotofase contínua), e foi observado se os cupins entraram ou não nas áreas tratadas e se selaram ou deixaram abertos os túneis construídos para a passagem do orifício central para os laterais (PAG).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por teste não-paramétrico.

3.2.3 Transmissão do Nimkol-L entre operários de *H. tenuis*

A transmissão dos produtos utilizados nas iscas, dos cupins atraídos para os cupins sadios do ninho, seria altamente desejável para ação efetiva sobre um maior número de indivíduos da colônia.

Foi desenvolvido um teste para avaliar a transferência do Nimkol-L, seguindo método baseado em Logan & Abood (1990). Estes autores avaliaram a transferência do hidrametilnon em *Reticulitermes santonensis* Feytaud (Isoptera: Rhinotermitidae) e *Microtermes lepidus* Sjöstedt (Isoptera: Termitidae).

Proporções variáveis (0:100, 10:90, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0) de operários alimentados em discos de papelão contendo o produto (tratados) e com discos de papelão sem tratar (não tratados) foram colocadas em placas de plástico contendo discos de papelão sem tratar, em três repetições para cada proporção. Os insetos tratados foram alimentados durante dois dias em discos de papelão previamente imersos em Nimkol-L (0,5% i.a.) antes de misturá-los com os insetos não tratados, alimentados com discos de papelão imersos em água destilada. Na proporção 100:0, estabeleceram-se dois grupos: um deles recebeu o mesmo tratamento que as demais proporções e o outro alimentou-se sempre em discos de papelão tratado com o produto. As placas foram mantidas em sala climatizada ($26\pm 3^{\circ}\text{C}$; $65\pm 15\%$ U.R.) e cobertas com plástico preto para simular escotofase contínua. A umidade no interior das placas foi mantida adicionando diariamente três a cinco gotas de água destilada em chumaço de algodão.

A mortalidade foi registrada num período de sete dias, incluindo-se os dois dias de alimentação prévia nos discos tratados. Ao término do período de sete dias (cinco dias após misturar os insetos tratados com os não tratados), comparou-se a mortalidade real observada com a teórica esperada em função da proporção de insetos contaminados com o produto. Os valores observados de mortalidade foram comparados com os esperados pelo teste de χ^2 , para um grau de liberdade ($p\leq 0,05$).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1 Toxicidade de derivados de meliáceas para *H. tenuis*

Dentre os extratos e derivados de meliáceas testados sobre *H. tenuis*, constatou-se a ação tóxica do produto comercial Nimkol (nas duas formulações testadas) à base de folhas de nim, em concentrações de 0,5 a 1% de ingrediente ativo (Tabela 1). A sobrevivência dos cupins alimentados com discos de papelão contendo os demais produtos avaliados, nas concentrações de 1, 2 e/ou 5%, não se diferenciou da testemunha ao final do período de avaliação de cada experimento.

Foi observado em alguns experimentos que o óleo de nim e os extratos de frutos de *T. pallida* e de sementes de nim afetaram a morfologia e/ou o comportamento dos operários. Eles se apresentaram com menor mobilidade que o normal e com o abdome menor e achatado (com sintomas de estresse) (Figura 2). Esses sintomas foram semelhantes aos observados nos insetos tratados com Nimkol-L antes de morrer e aos descritos por Bao & Yendol (1971) para cupins contaminados com *Beauveria bassiana*. Entretanto, com óleo de nim e os extratos de frutos de *T. pallida* e sementes de nim, apesar desses sintomas, a sobrevivência não foi afetada, no período de avaliação.

Figura 2 - Operários de *Heterotermes tenuis* sadios (a) e com o abdome deprimido por ação dos derivados de meliáceas (b).

No primeiro teste, avaliou-se a sobrevivência dos insetos alimentados com discos de papelão imersos em água destilada (testemunha com alimentação) e sem alimento (testemunha sem alimentação). Os dados de sobrevivência final foram analisados no 15º dia após a instalação, quando constatou-se que a mortalidade mantinha-se baixa nas testemunhas (Tabela 1 e Figura 3). Nos testes restantes, as avaliações foram realizadas no 6º ou 7º dias após a instalação do experimento. Nesse período, observou-se ação tóxica do Nimkol nas concentrações testadas e a mortalidade na testemunha manteve-se inferior a 15%.

Tabela 1. Sobrevivência (%; média $\pm$ EP_m) de *Heterotermes tenuis* alimentados com extratos, infusões (inf.) e derivados de melíáceas, no final da avaliação de diversos testes de laboratório (22 $\pm$ 1°C a 26 $\pm$ 2°C; 65 $\pm$ 15% a 70 $\pm$ 10% U.R. e escotofase contínua).

PRODUTO	TESTE 1 15 d.a.i. ¹	TESTE 2 6 d.a.i.	TESTE 3 6 d.a.i.	TESTE 4 7 d.a.i.
Testemunha s/alimento	100,0 $\pm$ 0,00 a	-	-	-
Testemunha c/alimento	96,2 $\pm$ 1,72 a	85,9 $\pm$ 1,81 a	98,1 $\pm$ 1,11 a	91,2 $\pm$ 3,95 a
<i>T. pallida</i> - Folha 5%	93,3 $\pm$ 1,76 a	78,1 $\pm$ 4,87 a	-	-
<i>T. pallida</i> - Ramo 5%	82,1 $\pm$ 5,34 a	89,6 $\pm$ 3,77 a	-	-
<i>T. pallida</i> - Fruto 5%	74,8 $\pm$ 13,84 a	-	-	89,4 $\pm$ 3,28 a
<i>T. pallida</i> - Fruto inf. ² 5%	-	-	-	89,4 $\pm$ 2,88 a
<i>M. azedarach</i> – Folha 5%	84,0 $\pm$ 2,81 a	87,4 $\pm$ 3,62 a	-	-
<i>M. azedarach</i> – Ramo 5%	87,9 $\pm$ 2,30 a	91,1 $\pm$ 2,22 a	-	-
<i>M. azedarach</i> – Fruto 5%	86,6 $\pm$ 6,55 a	86,8 $\pm$ 3,42 a	-	88,5 $\pm$ 3,60 a
<i>M. azedarach</i> – Fruto inf. 5%	-	-	-	91,3 $\pm$ 0,97 a
Óleo de nim 1%	89,1 $\pm$ 2,68 a	-	-	-
Óleo de nim 2%	-	-	-	-
Nim - Folha 1%	-	-	92,3 $\pm$ 3,51 a	-
Nim - Folha 5%	-	-	89,4 $\pm$ 4,26 a	-
Nim - Folha inf. 5%	-	-	-	88,2 $\pm$ 1,59 a
Nim – Semente 1%	-	-	94,3 $\pm$ 2,47 a	-
Nim – Semente 5%	-	89,7 $\pm$ 3,92 a	95,2 $\pm$ 1,84 a	-
Nim – Semente inf. 5%	-	-	-	90,5 $\pm$ 1,95 a
Nimkol-F 1% i.a.	-	2,2 $\pm$ 2,01 b	-	-
Nimkol-L 1% i.a.	-	-	6,7 $\pm$ 4,54 b	0,0 $\pm$ 0,00 b
Nimkol-F 0,5% i.a.	11,4 $\pm$ 4,10 b	-	-	-
C.V. %	17,19	9,68	8,15	6,96
D.M.S.	26,81	15,14	14,86	12,75

¹ d.a.i. = dias após instalação ² inf. = infusão

Resultados seguidos da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

No primeiro teste observou-se, depois de 15 a 20 dias da instalação, um incremento na mortalidade nos tratamentos testemunha, principalmente naquela sem alimentação. O Nimkol-F (0,5% i.a.) provocou mortalidade

significativamente maior que o resto dos tratamentos, sendo que o efeito começou a se evidenciar a partir do 5º dia de avaliação. A partir do 15º dia, também observou-se uma tendência (sem significância estatística) de efeito do extrato de frutos de *T. pallida* na sobrevivência do cupim (Figura 3).

T S/AL=testemunha sem alimento; T C/AL=testemunha com alimento; TPR=*Trichilia pallida* ramos 5%; TPFO=*T. pallida* folhas 5%; TPFR=*T. pallida* frutos 5%; MAR=*Melia azedarach* ramos 5%; MAFO=*M. azedarach* folhas 5%; MAFR=*M. azedarach* frutos 5%; NIMPF=Nimkol-F 0,5% i.a.; NIMOL=Óleo de nim 1%.

Figura 3 - Sobrevivência de *Heterotermes tenuis* alimentado com discos de papelão contendo extratos e derivados de meliáceas ($22\pm 1^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ U.R., escotofase contínua).

Os experimentos foram repetidos, incluindo-se diferentes extratos e derivados e sempre foi confirmado efeito tóxico sobre *H. tenuis* apenas para o Nimkol (Figuras 4 e 5).

TEST=testemunha; TPR=*Trichilia pallida* ramos 5%; TPFO=*T. pallida* folhas 5%; MAR=*Melia azedarach* ramos 5%; MAFO=*M. azedarach* folhas 5%; MAS=*M. azedarach* frutos 5%; NIMPF=Nimkol-F 1% i.a.; NIMS94=Sementes de nim 1%.

Figura 4 - Sobrevivência de *Heterotermes tenuis* alimentado com discos de papelão contendo extratos e derivados de meliáceas (23±2°C, 70±10% U.R., escotofase contínua).

TEST=testemunha; FOL= folhas de sementes de nim; SEM= sementes de nim; NIMKOL=Nimkol-L 1% i.a.

Figura 5 - Sobrevivência de *Heterotermes tenuis* alimentado com discos de papelão contendo extratos de folhas e sementes de nim e Nimkol-L (26±2°C, 65±15% U.R., escotofase contínua).

Estudou-se o efeito dos extratos a quente (infusões) de folhas e sementes de nim, obtendo-se resultados semelhantes aos observados com os extratos a frio.

Nenhum extrato ou infusão provocou níveis de mortalidade significativos para a espécie. O Nimkol, por sua vez, confirmou níveis de mortalidade próximos a 100% no final de aproximadamente uma semana de alimentação dos cupins, para uma concentração de 1% de i.a. (folhas de nim) (Figura 6).

TEST=testemunha; EX MaFV= extrato de frutos verdes de *Melia azedarach*; EX Tp5%= extrato de frutos de *Trichilia pallida*; INF NF= infusão de folhas de nim; INF NS= infusão de sementes de nim; INF MaFV= infusão de frutos verdes de *M. azedarach*; INF Tp= infusão de frutos de *T. pallida*.

Figura 6 - Sobrevivência de *Heterotermes tenuis* alimentado com discos de papelão contendo extratos e infusões e meliáceas e Nimkol-L ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 15\%$ U.R., escotofase contínua).

A não constatação de qualquer ação tóxica dos extratos testados sobre o cupim foi, de certa forma, inesperada já que os mesmos são ativos contra diversas outras espécies de insetos (Brunherotto & Vendramim, 2001; Rodríguez & Vendramim, 1997; Souza & Vendramim, 2000). É interessante

observar ainda a discrepância dos resultados obtidos com os extratos de folhas de nim e com o Nimkol, que também é extrato aquoso de folhas de nim, em formulação comercial.

O efeito tóxico dos extratos depende da espécie de artrópode sobre a qual estão agindo. Esse efeito varia para um mesmo inseto ainda de acordo com as diferentes partes de uma espécie vegetal ou de diferentes espécies vegetais. Assim, por exemplo, o extrato de ramos de *T. pallida* é mais eficiente que o extrato de folhas dessa espécie, para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Torrecillas & Vendramim, 2001) e *Bemisia tabaci* (Souza & Vendramim, 2000), ocorrendo o oposto com *Tuta absoluta* (Thomazini et al., 2000).

O efeito diferenciado dos extratos de folhas de nim, dependendo da origem, é comum com produtos biológicos já que a concentração de substâncias ativas varia em função de condições ambientais e também provavelmente por razões genéticas (Schmutterer, 1990). Poder-se-ia sugerir que nos inseticidas botânicos, que à semelhança dos denominados biológicos, também são naturais, a falta de padronização das substâncias ativas e a formulação afetem drasticamente o efeito tóxico desses produtos. A identificação da substância ativa, mínimas condições de padronização na preparação e a repetição de testes com os artrópodes de interesse são indispensáveis para a utilização prática de extratos vegetais no manejo de pragas.

Os resultados de Grace & Yates (1992) e Delate & Grace (1992) sugerem que a atividade tóxica de extratos de nim para *C. formosanus* não se deve à azadiractina, mas a outros componentes.

Os solventes utilizados na preparação dos extratos, constituem outro fator de importância na explicação da atividade tóxica dos mesmos, como explicam Adams et al. (1988) na discussão do efeito cupinicida de extratos de diversas espécies de *Juniperus*.

3.3.2 Repelência de *H. tenuis* para derivados de meliáceas

3.3.2.1 Testes em placas com ágar

Os testes em placas com ágar foram realizados com o intuito de estudar o padrão de construção de galerias dos cupins e o comportamento, no que se refere ao fechamento ou não das galerias por causa da rejeição dos produtos. Nenhum dos produtos testados provocou rejeição nos insetos.

Os cupins subterrâneos freqüentemente reagem na presença de produtos que podem ser nocivos selando as galerias para evitar o contato com os mesmos (Su et al., 1982). Tal comportamento não foi observado nos testes realizados nas placas com ágar, já que as galerias construídas no ágar permaneceram abertas em todos os casos (Figura 7).

Figura 7 - Galerias construídas por *H. tenuis* nas placas com ágar 2% (imagem de scanner). As setas indicam galerias na borda da placa.

Observou-se que os cupins foram construindo as galerias progressivamente até o encontro dos discos de papelão oferecidos como alimento. Então, circularam livremente pelas mesmas e, com o decorrer dos dias, foram construindo galerias próximas da parede das placas, acompanhando a borda das mesmas (Figura 7, setas). Não foi observada tendência de os insetos saírem, no início, em direção dos discos de papelão. Cerca da metade das galerias iniciais foi construída no ágar em direção aos discos de papelão, mas a outra metade foi iniciada sem um direcionamento preciso para os discos. Com o decorrer do tempo, as galerias foram direcionadas até os discos, com os insetos circulando livremente nas diferentes galerias e atingindo os discos de papelão, tanto nas testemunhas quanto nos tratamentos com produtos. Nenhuma galeria foi fechada com o intuito de evitar o contato com os produtos. Nos dias finais de observação, houve preferência dos cupins para permanecerem circulando nas galerias construídas na borda das placas, o que permitiu a alimentação nos discos e a permanência na proximidade das paredes da placa o que confirma o tigmotropismo característico desses insetos.

A não rejeição da sulfluramida por *H. tenuis* concorda com observações de Alves & Macedo² em trabalho realizado com método e recipientes idênticos e discos de papelão contendo sulfluramida na concentração de 157 ppm. Nesse trabalho os autores observaram que houve fechamento de galerias quando os cupins foram colocados na presença de discos de papelão contendo imidacloprid.

Com base na medida do comprimento das galerias no sexto ou sétimo dias de observação, constatou-se que apenas os derivados do nim provocaram indícios de rejeição, quando comparados os quadrantes correspondentes às testemunhas e aos discos tratados (Tabela 2).

² ALVES, S.B.; MACEDO, D. (ESALQ/USP) Comunicação pessoal, 2001.

Na comparação do comprimento das galerias nos quadrantes com discos testemunha e com discos tratados, bem como por meio do cálculo do Índice de Preferência (I.P.) nenhum dos produtos foi considerado como repelente para *H. tenuis*. Os compostos à base de folhas de nim foram classificados como neutros, embora tenham apresentado valores de I.P. (-0,09 e -0,10, respectivamente), próximos do limite para caracterização como repelentes.

Tabela 2. Comprimento de galerias (cm; média $\pm$ EP_m), percentagem nos quadrantes das placas correspondentes a discos testemunha ou tratados com os produtos e Índice de Preferência (I.P.) no final do período de observação, em laboratório. (27 $\pm$ 2°C; escotofase contínua).

	Nimkol-L	Óleo de nim	Sulfluramida	Extratos aquosos (5% p/v)		
	(1% i.a.)	(2% v/v)	(157 ppm)	Folhas nim	Sementes nim	Frutos <i>T. pallida</i>
Galerias (cm) em quadrantes produto	21,3 $\pm$ 2,32 a ¹	41,7 $\pm$ 8,68 a	17,2 $\pm$ 3,96 a	26,1 $\pm$ 1,86 a	25,9 $\pm$ 5,24 a	33,7 $\pm$ 2,45 a
Galerias (cm) em quadrantes Testemunha	23,9 $\pm$ 2,58 a	45,4 $\pm$ 7,37 a	15,6 $\pm$ 2,22 a	31,6 $\pm$ 3,33 a	27,0 $\pm$ 2,96 a	28,3 $\pm$ 5,27 a
% galerias em quadrantes produto	45,5 $\pm$ 1,01 B	47,5 $\pm$ 1,37 B	51,0 $\pm$ 6,93 A	45,6 $\pm$ 1,89 B	47,7 $\pm$ 3,68 A	55,4 $\pm$ 6,85 A
% galerias em quadrantes Testemunha	54,5 $\pm$ 1,01 A	52,5 $\pm$ 1,37 A	49,0 $\pm$ 6,93 A	54,4 $\pm$ 1,89 A	52,3 $\pm$ 3,68 A	44,6 $\pm$ 6,85 A
I. P.	-0,09	-0,05	+0,17	-0,09	-0,05	+0,11

¹ Valores seguidos da mesma letra na coluna, minúscula para comprimento e maiúscula para percentagem, não diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) pelo teste não-paramétrico.

Já quando a análise não-paramétrica foi realizada com a percentagem de galerias correspondentes a ambos tipos de quadrantes, o Nimkol-L (1% i.a.), o

extrato de folhas de nim (5% p/v) e o óleo de nim (2% v/v) mostraram indícios de rejeição por parte dos cupins.

3.3.2.2 Testes em arenas de preferência

Os testes em arenas de preferência foram realizados para quantificar a proporção de insetos presentes, em determinados momentos de avaliação, nos discos tratados com os produtos e nos discos testemunha.

Esse método teve limitações porque os cupins, por seus hábitos sociais, não manifestam uma verdadeira capacidade individual de opção, já que comportam-se mais como grupo. Por outro lado, devido a sua capacidade de se comunicar por meio de sinais (químicos ou táteis), parece válido estudar o comportamento do grupo, desde que se houver rejeição por determinados produtos, provavelmente eles poderiam se utilizar de sinais para passar essas informações uns aos outros.

Foi possível observar a circulação dos insetos dentro dos tubos de comunicação entre as placas e nas diferentes placas, fato que indica que eles poderiam evitar placas com produtos rejeitáveis, ainda que não sendo uma escolha individual e sim do grupo.

Primeiramente pode ser analisado o comportamento da espécie em relação ao método e o recipiente utilizado nos testes. Para tanto, foi contado o número de insetos presentes nos discos, tratados e não tratados com o produto e o número de insetos fora dos discos (Tabela 3).

Independentemente da significação estatística das contagens realizadas nos diferentes momentos, observa-se que para a média dos momentos de avaliação a maioria dos insetos estava presente nos locais com discos de papelão, fossem estes tratados com o produto ou testemunha. A proporção média de insetos na placa central, ou seja sem discos de alimentação variou

entre o mínimo de 8,4% e o máximo de 25,4%, para o Nimkol-L e a sulfluramida, respectivamente.

Tabela 3. Proporção de insetos presentes nos discos tratados e não tratados (testemunha) e de insetos fora dos discos, nas arenas de preferência, em diferentes momentos de avaliação.

		PORCENTAGEM					
PRODUTO	AVALIAÇÃO	1	2	3	N-PARAM		
		Nimkol	Test.	Fora	1-2	1-3	2-3
Nimkol-L	1 hora 30'	71,7	26,7	1,7	NS	NS	NS
	5 horas 45'	81,7	12,9	5,4	NS	NS	NS
	21 horas	81,7	6,7	11,7	NS	NS	NS
	24 horas	89,2	6,3	4,6	NS	NS	NS
	29 horas	75,8	5,4	18,8	NS	NS	NS
	MÉDIA	80,0	11,6	8,4			
PRODUTO	AVALIAÇÃO	NIFO 5%	Test.	Fora	1-2	1-3	2-3
Extrato de folhas de Nim 5%	1 hora 30'	20,9	50,0	29,1	NS	**	NS
	5 horas	18,0	71,4	10,6	**	NS	NS
	20 horas	24,4	70,7	4,9	**	NS	NS
	24 horas	46,8	48,6	4,7	NS	*	**
	48 horas	39,6	56,8	3,5	NS	**	***
	72 horas	43,2	50,6	6,3	NS	NS	NS
	96 horas	36,5	60,7	2,8	NS	NS	**
	MÉDIA	32,8	58,4	8,8			
PRODUTO	AVALIAÇÃO	SULFLUR.	Test.	Fora	1-2	1-3	2-3
Sulfluramida 157 ppm	1 hora 30'	31,1	52,7	16,1	NS	NS	NS
	5 horas 45'	31,7	39,5	28,8	NS	NS	NS
	21 horas	33,3	65,0	1,7	NS	NS	NS
	24 horas	27,8	43,3	28,8	NS	NS	NS
	29 horas	41,7	20,0	38,3	NS	NS	NS
	46 horas 30'	36,2	28,3	35,5	NS	NS	NS
	49 horas 30'	42,8	28,8	28,3	NS	NS	NS
	MÉDIA	34,9	39,7	25,4			

Tabela 3. Proporção de insetos presentes nos discos tratados e não tratados (testemunha) e de insetos fora dos discos, nas arenas de preferência, em diferentes momentos de avaliação.

PRODUTO	AVALIAÇÃO	PORCENTAGEM					
		1	2	3	N-PARAM		
		NIS 5%	Test.	Fora	1-2	1-3	2-3
Extrato de sementes de Nim 5%	1 hora 30'	37,8	19,5	42,7	NS	NS	NS
	5 horas	56,7	27,3	16,0	NS	NS	NS
	20 horas	70,0	26,0	4,0	**	**	NS
	24 horas	67,9	27,1	5,0	NS	**	NS
	48 horas	74,8	22,8	2,5	NS	NS	NS
	72 horas	63,2	31,4	5,4	NS	NS	NS
	96 horas	71,7	24,7	3,6	**	***	NS
	MÉDIA	63,2	25,5	11,3			

NS = não significativo; * = $p \leq 0,10$; ** = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,01$, pelo teste de comparação de médias não-paramétrico

As proporções observadas no teste com extratos de nim foram próximas ao valor observado para Nimkol-L (8,8 e 11,3% para extrato de folhas e de sementes, respectivamente). Com base nestas observações, pode-se dizer que nas arenas de preferência uma grande proporção dos insetos escolheu as caixas com discos de papelão, em relação à alternativa de ficar na caixa central, sem alimento.

Considerando-se apenas a totalidade de insetos presentes nos discos de papelão, estudou-se a proporção dos mesmos presentes nos discos contendo produto e nos discos testemunha (Tabela 4).

Tabela 4. Proporção de insetos em discos tratados e não tratados (testemunha), do total de insetos presentes nos discos, nas arenas de preferência, em diferentes momentos de avaliação.

PORCENTAGEM						
AVALIAÇÃO	Nimkol-L	Test.	N-param	Sulfluramida	Test.	N-param
1 hora 30'	73,7	26,7	NS	37,1	62,9	NS
5 horas 45'	84,0	16,0	**	44,5	55,5	NS
21 horas	94,2	5,8	**	33,9	66,1	NS
24 horas	93,5	6,5	**	39,1	60,9	NS
29 horas	91,2	8,8	**	67,6	32,4	NS
46 horas 30'	-	-		54,5	45,5	NS
49 horas 30'	-	-		59,7	40,3	NS
MÉDIA	87,3	12,7		48,1	51,9	

AVALIAÇÃO	NIFO 5%	Test.	N-param	NIS 5%	Test.	N-param
1 hora 30'	22,5	77,5	**	71,6	28,4	NS
5 horas	21,2	78,8	***	67,8	32,2	NS
20 horas	24,8	75,2	**	73,8	26,2	NS
24 horas	49,1	50,9	NS	72,4	27,6	**
48 horas	41,2	58,8	NS	77,2	22,8	**
72 horas	46,6	53,4	NS	67,3	32,7	NS
96 horas	37,5	62,5	NS	73,1	26,9	**
MÉDIA	34,7	65,3		71,9	28,1	

NIFO = Extrato de folhas de nim; NIS = Extrato de sementes de nim

NS = não significativo; * = $p \leq 0,10$; ** = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,01$, pelo teste de comparação de médias não-paramétrico

Em relação aos produtos formulados, os insetos não manifestaram qualquer indício de rejeição ou de preferência pela sulfluramida, sendo que aproximadamente metade dos insetos (48,1%), em média, estavam presentes

nos discos tratados e a outra metade (51,9%) nos discos testemunha. Já no caso do Nimkol-L, houve preferência significativa dos cupins por se alimentarem dos discos tratados com o produto (87,3%) em comparação com os discos testemunha (12,7%). Com exceção da primeira avaliação, uma hora e meia depois de liberados os insetos, nas demais avaliações, a preferência pelo derivado do nim foi significativa.

A preferência manifestada pelos cupins por um produto que lhes causa mortalidade é, *a priori*, inesperada. Entretanto, as respostas desses insetos aos compostos químicos é dependente do tipo de produto e nem sempre é imediata. Grace et al. (1992) indicaram que operários de *Coptotermes formosanus* construíram galerias em areia tratada com o inseticida de solo silafluofen até concentrações de 500 ppm, mas conseguiram construí-las quando a concentração foi igual ou maior que 1000 ppm. Embora as concentrações de 1, 10, 100 e 500 ppm não tenham evitado a penetração dos cupins na areia tratada, a atividade foi progressivamente diminuindo, indicando reação de repelência posterior. Essa reação de repelência foi observada na concentração de 10 ppm, que não provocou mortalidade significativa.

Entretanto, Grace & Yates (1992) indicaram que o inseticida comercial Margosan-O, à base de nim, não foi ativo como repelente de contato para *C. formosanus*. Os operários dessa espécie ingressaram rapidamente em recipientes com areia tratada até na concentração de 500 ppm do produto, sem mortalidade significativa num período de sete dias. Porém, a exposição crônica ao produto aparentemente provocou aumento gradativo da rejeição do produto pelo cupim e da mortalidade. Isto poderia indicar que deve transcorrer um determinado tempo, depois do contato com os produtos químicos, para os cupins manifestarem uma resposta de rejeição.

Os cupins apresentaram comportamento oposto frente aos extratos aquosos preparados no laboratório. Houve preferência pelo extrato de sementes de nim (5% p/v) e rejeição pelo extrato de folhas de nim (5% p/v). Para o caso do extrato de folhas, a repelência foi significativa nas avaliações

realizadas durante as primeiras 20 horas. A partir desse momento, manteve-se uma tendência à rejeição, embora não significativa. Contrariamente, no caso do extrato de sementes de nim, a preferência dos insetos manifestou-se desde o início, e somente tornou-se significativa após as primeiras 20 horas de avaliação.

Para a média dos momentos de avaliação, a proporção de insetos presentes nos discos com extrato de nim a 5% e na testemunha foi de 34,7 e 65,3% para folhas e 71,9 e 28,1% para sementes, respectivamente.

De modo semelhante ao que foi constatado para toxicidade, também nesse caso, observou-se o efeito diferente do extrato aquoso de folhas de nim preparado no laboratório e da formulação comercial Nimkol-L, também à base de folhas de nim. O extrato preparado no laboratório não afetou a sobrevivência dos insetos, mas apresentou evidência de ser rejeitado por eles. Poder-se-ia sugerir que na forma mais simples de preparação esse extrato se apresente como repelente. O Nimkol-L, contrariamente, não foi rejeitado pelos cupins e evidenciou ação inseticida para a espécie. Embora não avaliada quanto ao efeito tóxico sobre a espécie, a sulfluramida apareceu como neutra nos testes realizados nas arenas de preferência. O extrato de sementes de nim foi preferido pelos cupins, embora não tenha manifestado qualquer efeito sobre os mesmos nos testes de toxicidade.

O método e os recipientes empregados apresentaram-se apropriados para os estudos de preferência com *H. tenuis* e para quantificar a aceitação ou rejeição dos produtos a serem testados, incorporando-os em discos de papelão.

3.3.2.3 Testes em placas sem ágar

Nos estudos de preferência realizados em placas de plástico sem ágar, observou-se que os insetos, liberados no centro das placas, visitaram livremente os discos. Foi constatado que nos primeiros períodos de avaliação (aproximadamente nas primeiras seis a oito horas, dependendo do teste), com exceção do teste com Nimkol, houve maior número de insetos nos discos, sendo que depois desse período a maioria preferiu percorrer as bordas das placas (Tabela 5).

Tabela 5. Proporção de insetos presentes nos discos tratados e não tratados (testemunha) e de insetos fora dos discos, nas placas sem ágar, em diferentes momentos de avaliação.

<i>PRODUTO</i>	<i>AVALIAÇÃO</i>	<i>PORCENTAGEM</i>					
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>N-PARAM</i>		
		<i>Nimkol</i>	<i>Test.</i>	<i>Fora</i>	<i>1-2</i>	<i>1-3</i>	<i>2-3</i>
Nimkol-L	1 hora	46,4	7,2	46,4	**	NS	***
	3 horas	42,8	4,0	53,2	**	NS	***
	6 horas	27,2	10,8	62,0	NS	NS	**
	22 horas	12,4	4,4	83,2	NS	NS	**
	25 horas	9,2	1,2	89,6	**	NS	***
	29 horas	7,6	4,0	88,4	NS	NS	*
	48 horas	5,2	5,2	89,6	NS	**	*
	MÉDIA	21,5	5,3	73,2			

Tabela 5. Proporção de insetos presentes nos discos tratados e não tratados (testemunha) com os produtos e de insetos fora dos discos, nas placas sem ágar, em diferentes momentos de avaliação.

PRODUTO	AVALIAÇÃO	PORCENTAGEM					
		1	2	3	N-PARAM		
		Óleo	Test.	Fora	1-2	1-3	2-3
Óleo de nim 2%	5 horas	47,3	38,0	14,7	NS	*	NS
	8 horas	56,0	15,3	28,7	NS	NS	NS
	23 horas	4,0	3,3	92,7	NS	NS	NS
	26 horas	18,7	10,7	70,7	NS	NS	NS
	29 horas	26,7	5,3	68,0	NS	NS	NS
	32 horas	30,0	5,3	64,7	NS	NS	*
	47 horas	10,0	3,3	86,7	NS	NS	**
	50 horas	3,3	2,7	94,0	NS	NS	NS
	54 horas	6,7	4,7	88,7	NS	NS	NS
	71 horas	4,7	0,7	94,7	NS	NS	NS
	79 horas	6,7	2,0	91,3	NS	NS	NS
	105 horas	6,7	2,0	91,3	NS	NS	NS
	119 horas	22,7	6,7	70,7	NS	NS	**
	MÉDIA	18,7	7,7	73,6			
PRODUTO	AVALIAÇÃO	Sulflur.	Test.	Fora	1-2	1-3	2-3
Sulfluramida 157 ppm	1 hora	44,0	24,6	31,4	NS	NS	NS
	3 horas	50,6	42,6	6,6	NS	NS	NS
	6 horas	41,4	24,6	34,0	NS	NS	NS
	22 horas	13,4	33,4	53,4	NS	NS	NS
	25 horas	10,0	15,4	74,6	NS	NS	NS
	29 horas	9,4	45,4	45,4	NS	NS	NS
	48 horas	16,6	46,0	37,4	NS	NS	NS
	51 horas	16,6	52,0	31,4	NS	NS	NS
	MÉDIA	25,3	35,5	39,3			

NS = não significativo; * = $p \leq 0,10$; ** = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,01$, pelo teste de comparação de médias não-paramétrico

Com o Nimkol, nas primeiras duas avaliações houve aproximadamente metade dos insetos nos discos e metade fora deles. A partir da avaliação de seis horas verificou-se também maior número de insetos fora dos discos.

Para ambos os derivados do nim avaliados, Nimkol-L (1% i.a.) e óleo de nim (2% v/v), observou-se alta proporção de insetos fora dos discos, nos períodos de avaliação. Essa proporção foi, para a média dos períodos, 73,2% e 73,6% para o Nimkol-L e o óleo, respectivamente. Nos testes realizados com sulfluramida, observou-se uma proporção menor de insetos (39,3% para a média dos períodos de avaliação) andando livremente nas placas, fora dos discos,.

Quando analisada por período de avaliação, essa tendência de os insetos permanecerem fora dos discos nem sempre foi significativa, mas em termos gerais, apresentou-se com maior evidência depois das primeiras seis a oito horas de avaliação. Provavelmente esse fato seja devido ao forte tigmotropismo desses insetos, que procuram rapidamente a borda da placa, permanecendo em contato com as paredes da mesma. Pode-se sugerir, então, que o recipiente não se apresenta como apropriado para estudar a preferência ou repelência de cupins. Porém, pode ser estudado o comportamento dos insetos nas avaliações iniciais, com o objetivo de ver se é possível fazer uma discriminação rápida, o que poderia ser de valiosa ajuda para o estabelecimento de testes rápidos quando se necessita uma avaliação preliminar de um grande número de produtos.

Quando comparada a proporção de insetos presentes nos discos testemunha e produto, considerando apenas o número de insetos presentes nos discos, confirmou-se a preferência dos cupins pelo Nimkol-L, de igual forma como foi observado nas arenas de preferência. Para esse produto, não houve diferença em considerar a porcentagem média de insetos nos discos tratados para o total de períodos de avaliação (78,1%) ou apenas as duas iniciais, até três horas após a liberação dos cupins nas placas (89,8%) (Tabela 6).

O óleo de nim (2% v/v) apresentou efeito similar ao observado para o Nimkol-L, tanto na tendência a ser preferido pelos insetos quanto a não ter variado a proporção média de insetos presentes nos discos tratados, em função dos períodos de avaliação (72,1% e 67,9%, em média, até 119 e oito horas após a liberação dos insetos, respectivamente).

Tabela 6. Proporção de insetos em discos tratados e não tratados (testemunha) com os produtos, do total de insetos presentes nos discos, nas placas sem ágar, em diferentes momentos de avaliação.

AVALIAÇÃO	Nimkol-L	Test.	N-param
1 hora	87,2	12,8	***
3 horas	92,3	7,7	***
Média até 3 horas	89,8	10,3	
<i>Média até 51 horas</i>	<i>78,1</i>	<i>21,9</i>	
	Óleo 2%	Test.	N-param
5 horas	57,7	42,3	NS
8 horas	78,1	21,9	*
Média até 8 horas	67,9	32,1	
<i>Média até 119 horas</i>	<i>72,1</i>	<i>27,9</i>	
	Sulfluramida	Test.	N-param
1 hora	64,1	35,9	NS
3 horas	54,3	45,7	NS
6 horas	58,9	41,1	NS
22 horas	28,6	71,4	NS
29 horas	17,1	82,9	NS
48 horas	26,6	73,4	*
51 horas	26,3	73,7	*
Média até 51 horas	39,4	60,6	

NS = não significativo; * = $p \leq 0,10$; ** = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,01$, pelo teste de comparação de médias não-paramétrico

Já para o caso da sulfluramida, houve uma diferença maior que para os outros dois produtos testados, em função da duração do período de avaliação. Quando considerado o período total de observação (até 51 horas após a liberação), apenas 39,4% dos insetos foram contados nos discos tratados com o inseticida. A partir das 22 horas de iniciado o experimento, as avaliações mostraram maior número de insetos nos discos testemunha, embora a rejeição dos discos tratados com o produto tenha sido significativa apenas nos últimos dois períodos de avaliação (48 e 51 horas após a liberação). A caracterização próxima à neutralidade desse inseticida, nas primeiras avaliações concorda mais com os resultados obtidos nas arenas de preferência (Tabela 4) e com o fato de ser o produto para o qual foi encontrada uma maior proporção de insetos nos discos, e menor fora deles, quando considerado o total de insetos liberados (Tabela 3). Entretanto é possível que os insetos tenham começado a rejeitar o produto a partir das 22 horas de liberados nas placas.

Na comparação dos recipientes sem ágar utilizados, as arenas de preferência parecem apropriadas quando o número de extratos a ser testados não for excessivo. Caso contrário, poder-se-ia utilizar o método das placas, fazendo avaliações preliminares rápidas (até seis ou oito horas após a liberação dos insetos) e fazer uma triagem para reduzir o número de produtos nos testes em arenas de preferência.

Na comparação dos recipientes com e sem ágar, os primeiros parecem apropriados para estudar o comportamento dos insetos em laboratório e para determinar qualitativamente comportamento de rejeição por certos produtos. Já quando o interesse é quantificar o grau de preferência ou repelência, parece ser mais adequado o uso de recipientes sem ágar e uma sequência de avaliações no tempo. Nesse caso, sugere-se um maior número de avaliações iniciais, poucas horas após a liberação dos insetos, para o caso das placas e um período de avaliação total de alguns dias, para o caso das arenas de preferência.

3.3.3 Transmissão de Nimkol-L entre operários de *H. tenuis*

O contato freqüente entre cupins de uma mesma comunidade possibilita a passagem dos agentes estressores de um indivíduo para os outros. Tal efeito já foi comprovado para fungos entomopatogênicos (Gusmão et al., 1999; Kramm et al., 1982) devido provavelmente aos hábitos de limpeza mútua do corpo e de troca de alimentos. Os conídios dos fungos podem passar de indivíduos contaminados para outros sadios, tornando mais efetiva a contaminação dos integrantes da colônia.

A troca de fluidos corporais pode determinar também a passagem de substâncias tóxicas entre indivíduos, como demonstrado por Logan & Abood (1990) para o hidrametilnon em *Reticulitermes santonensis* e *Microtermes lapidus*.

No teste realizado com Nimkol-L, não foram observados indícios da transmissão das substâncias responsáveis pela toxicidade entre os operários de *H. tenuis* (Figura 8). Na hipótese de ocorrência de transmissão dos compostos ativos do Nimkol-L devia-se esperar uma proporção de indivíduos mortos maior que aquela inicialmente contaminada por alimentação com o produto. Os valores de mortalidade em todos os casos foram inferiores aos teoricamente esperados de acordo com a proporção de contaminação.

A comprovação da ação tóxica do Nimkol-L, na concentração utilizada, visualiza-se com o tratamento de 100% de operários alimentados ao longo do período de avaliação com papelões impregnados com o produto, no qual atingiu-se mortalidade quase total (98%) no sétimo dia de avaliação. Entretanto, quando 100% dos operários foram alimentados com discos contendo o produto (durante os dois primeiros dias do teste) e passados depois para discos sem tratar, atingiu-se apenas 62,2% de mortalidade corrigida no sétimo dia (Tabela 7). Os resultados indicam que os dois dias iniciais de alimentação com o Nimkol-L não foram suficientes para que a totalidade dos indivíduos do

tratamento atingisse a dose letal, ou então, da capacidade dos mesmos liberarem o agente tóxico antes de morrerem.

Figura 8 - Mortalidade teórica esperada e real observada, no 7º dia, segundo proporção de insetos alimentados em discos tratados com Nimkol-L 0,5% i.a. durante dois dias e, posteriormente, alimentados só com papelão, e a testemunha 100/0 alimentada sempre em discos tratados com Nimkol-L.

Tabela 7. Percentagens de mortalidade observada (MOC) (corrigida por Abbott, 1925) e mortalidade teórica esperada (MTE), no 7º dia, para as diferentes proporções de cupins alimentados com discos tratados (A) com Nimkol-L 0,5% i.a. nos dois dias iniciais e não alimentados (NA).

TRATAMENTO	A/NA	MOC	MTE	χ^2 ¹
2	10/90	3,5	10	5,28 **
3	25/75	17,8	25	2,74 *
4	50/50	27,6	50	20,13 **
5	75/25	53,0	75	25,01 **
6	100/0	62,2	100	1334,52 **
7 ²	100/0	97,8	100	1,38 ns

¹ Teste χ^2 entre MOC e MTE, para 1 grau de liberdade, Valores de tabela de $\chi^2(0,05; 1) = 3,48$; $\chi^2(0,10; 1) = 2,71$

² Testemunha 100% sempre alimentada com Nimkol-L 0,5% i.a.

Com exceção do tratamento com 25% de indivíduos inicialmente contaminados com o Nimkol-L (25/75) e o tratamento com a totalidade dos insetos sempre se alimentando nos discos com produto (100/0), nos restantes tratamentos ocorreu mortalidade significativamente inferior à mortalidade teórica esperada, pelo teste de χ^2 , o que sugere que não houve transferência do tóxico entre indivíduos.

Pode-se estabelecer que a ação do Nimkol-L foi ineficaz, desde que valores de mortalidade observados (MOC) foram menores que as proporções iniciais de contaminação (MTE), em quase todos os tratamentos com apenas dois dias de alimentação inicial com o produto. Entretanto, o método e o tempo de contato inicial com o produto empregados parece apropriado para representar o que ocorre em condições naturais no campo, onde os insetos se alimentam nas iscas (forrageamento) e depois voltam para o ninho, onde deveriam transmitir o agente tóxico para contaminar outros indivíduos. Estes

resultados sugerem que isto não ocorre no caso dos ativos tóxicos do Nimkol-L e os operários de *H. tenuis*.

A hipótese de desintoxicação não pode ser descartada já que os cupins, ao longo de sua evolução, desenvolveram adaptações bioquímicas que os capacitaram para desintoxicar os venenos de contato que produzem. Embora os estudos desses mecanismos, nos rinotermitídeos, tenham comprovado a eficiência de desintoxicação dos venenos de origem co-específica mas não para as secreções de outras espécies, os cupins estão sob pressão evolucionária para desenvolver outros meios de desintoxicação que permitam maior conservação de nitrogênio, necessário para a síntese de proteínas, determinando que algumas espécies apresentem surpreendentes habilidades de desintoxicação, inéditas no mundo dos insetos (Costa-Leonardo, 1989).

3.4 Conclusões

O Nimkol-L é tóxico para *H. tenuis*. Os extratos aquosos de folhas de nim, de *Melia azedarach* e de *Trichilia pallida*, assim como o óleo de nim, não afetam significativamente a sobrevivência da espécie.

Os derivados vegetais, em geral, não são rejeitados por *H. tenuis*, com exceção do extrato de folhas de nim que, na concentração de 5%, é repelido em recipientes sem ágar.

Não há evidências de transmissão dos ingredientes ativos de Nimkol-L entre indivíduos.

4 COMPATIBILIDADE DO NIMKOL-L COM ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* E *Metarhizium anisopliae*

Resumo

A compatibilidade do Nimkol-L[®], formulação comercial de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*), com os isolados 1037 de *Metarhizium anisopliae* e 634 de *Beauveria bassiana*, foi avaliada *in vitro*. Foram desenvolvidos dois testes para avaliar o efeito do Nimkol-L sobre o crescimento vegetativo e a produção de conídios dos fungos entomopatogênicos. No primeiro, o produto foi incorporado em meio de cultura sólido (BDA), em placas de Petri, nas concentrações de 0; 0,74; 1,84; 3,68 e 18,4% i.a. No segundo, o produto foi aplicado na superfície do meio BDA contido nas placas, nas concentrações de 0; 0,2; 0,5; 1 e 5% i.a. Com base nas variáveis estudadas, o Nimkol foi caracterizado aplicando-se o modelo T de classificação de produtos (Alves et al., 1998). Também foi avaliado o efeito do Nimkol-L sobre a germinação dos conídios. O Nimkol-L foi compatível com *M. anisopliae* (1037) até 1% i.a. e com *B. bassiana* (634) até 1,84% i.a. Entre 0,2 e 1% i.a., o Nimkol-L não inibiu significativamente a germinação dos conídios. Em concentrações de 5% i.a. ou maiores, o Nimkol-L afetou significativamente todas as variáveis avaliadas, para ambos isolados.

Summary

The compatibility of Nimkol-L[®], commercial formula of aqueous extract of neem leaves (*Azadirachta indica*), with isolate 1037 of *Metarhizium anisopliae*

and isolate 634 of *Beauveria bassiana*, was tested *in vitro*. Two experiments were developed for testing the effect of Nimkol-L on vegetative growth and conidia production of entomopathogenic fungi. In the first one, the product was incorporated on a solid culture media (PDA), in Petri dishes, at concentrations of 0, 0.74, 1.84, 3.68, and 18.4% a.i. In the second experiment, the product was applied on the surface of PDA media within the dishes, at concentrations of 0, 1.2, 0.5, 1 and 5% a.i. Based on the variables studied, Nimkol-L was characterized according to the model T for classification of products (Alves et al., 1998). The effect of Nimkol-L was also measured on the germination of conidia. Nimkol-L was compatible with *M. anisopliae* (1037) up to 1% a.i., and with *B. Bassiana* (634) up to 1.84% a.i. The germination of conidia was not significantly inhibited by Nimkol-L, between 0.2 and 1% a.i. At concentrations higher than 5% a.i., Nimkol-L significantly affected all the variables measured in both isolates.

4.1 Introdução

O controle associado dos insetos, com a utilização simultânea de um ou mais métodos de controle, é uma alternativa que vem sendo explorada na atualidade. No caso de produtos fitossanitários, quando utilizados simultaneamente com fungos entomopatogênicos, podem melhorar o efeito destes, contribuindo para uma maior eficiência de controle (Moino Júnior, 1998).

A ação estressora de certos compostos pode afetar a resistência comportamental observada naturalmente nos cupins, alterando seus hábitos de limpeza. O produto pode agir de forma sinérgica, permitindo que uma maior quantidade de conídios possa germinar e iniciar o processo de doença, como constatado por Moino Júnior (1998) para imidacloprid e *B. bassiana* e *M. anisopliae*, em testes com *Heterotermes tenuis*.

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos

produtos e das concentrações utilizadas. Esses produtos podem atuar inibindo o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação dos microrganismos, e até causar mutações genéticas, fatores que podem levar à diminuição da virulência à determinada praga (Alves et al., 1998). O uso combinado de atrativos (iscas) com patógenos para intensificar o contato da praga com as toxinas, e garantir o efeito de controle é recomendado por alguns autores, segundo Martius (1998).

A estratégia de controle de *H. tenuis* por meio de iscas de papelão corrugado impregnadas com inseticidas e fungos entomopatogênicos deve considerar os possíveis efeitos fungitóxicos dos produtos a serem utilizados (Moino Júnior, 1998).

Segundo Alves et al. (1998), faltam informações referentes às interações entre os entomopatógenos e agrotóxicos em condições de campo. Entretanto, como os estudos *in vitro* expõem ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, isto fornece confiabilidade sobre os resultados de seletividade.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade *in vitro* do Nimkol-L com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

4.2 Material e métodos

Os experimentos para o estudo da compatibilidade do Nimkol-L[®] com fungos entomopatogênicos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP.

Foram utilizados os isolados 634 de *Beauveria bassiana* e 1037 de *Metarhizium anisopliae*, produzidos em placas de Petri com meio de cultura

específico para esporulação MC³, a partir do material armazenado no banco de patógenos do Laboratório de Patologia de Insetos da ESALQ/USP.

O Nimkol-L foi selecionado com base nos resultados obtidos nos experimentos descritos no item 3.2.1, que demonstraram a toxicidade desse produto para *H. tenuis*.

4.2.1 Crescimento de colônias e produção de conídios

Foram realizados dois testes de compatibilidade do Nimkol-L com os fungos. No primeiro, o produto foi adicionado ao meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) ainda líquido, a uma temperatura próxima dos 40°C. As concentrações avaliadas foram 0; 0,74; 1,84; 3,68 e 18,4% i.a., equivalentes a 0; 740; 1840; 3680 e 18400 ppm, respectivamente. Seguidamente, o meio foi vertido em placas de Petri. Os entomopatógenos, após a solidificação do meio com o produto, foram inoculados com alça de platina em três pontos por placa, em três placas por tratamento, em capela de fluxo laminar. No segundo teste, as concentrações avaliadas foram 0; 0,2; 0,5; 1 e 5% i.a., equivalentes a 0; 200; 500; 1000 e 5000 ppm, respectivamente. Para cada tratamento, 1 ml do produto foi vertido sobre a superfície do meio de cultura nas placas. Uma vez seca a superfície, procedeu-se à inoculação dos entomopatógenos, de idêntica forma que no primeiro teste.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em B.O.D. (26±0,5°C; fotofase 12 horas) por um período de cinco dias no primeiro teste, e de seis dias, no segundo, quando então foi medido o diâmetro médio das colônias e contados os conídios produzidos por colônia, em câmara de Neubauer (Alves et al., 1998). Para tanto, as colônias foram recortadas do meio de cultura, com auxílio de vazador e colocadas em tubos de vidro de 9,0 cm x 3,0 cm, nos quais

³ Composição do meio MC: Fosfato de potássio: 0,36g; Fosfato de sódio: 1,05g; Sulfato de magnésio: 0,60g; Cloreto de potássio: 1,00g; Glucose: 10,00g; Nitrato de sódio: 1,58g; Extrato de levedura: 5,00g; Ágar: 20,00g; Água destilada: 1000,00 ml.

foram feitas as diluições necessárias em água destilada estéril mais espalhante adesivo Tween 80[®] (0,01% v/v), procedendo-se a agitação em agitador de tubos, marca Marconi, modelo 162, e agitador de ultra-som modelo 450 (E/MC Corp. RAI Research Division), utilizando-se um pincel para o completo desprendimento e suspensão dos conídios.

4.2.2 Classificação da toxicidade do Nimkol-L para os fungos entomopatógenos

Para classificação da compatibilidade do produto com os entomopatógenos foi utilizado o modelo T (Alves et al., 1998), desenvolvido para caracterizar a compatibilidade de fungos entomopatogênicos com produtos inseticidas em estudos *in vitro*, em meio de cultura sólido. Assim, calcularam-se os valores percentuais médios de esporulação e crescimento vegetativo das colônias dos fungos com relação à testemunha (100%), aplicando-se em seguida, para cada concentração do produto, a seguinte fórmula:

$$T = [20(CV) + 80(ESP)]/100$$

onde:

T = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto

CV = porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha

ESP = porcentagem de esporulação com relação à testemunha

4.2.3 Germinação de conídios

Considerando a importância da germinação dos conídios dos entomopatógenos, para a eficiente contaminação dos insetos, foi avaliado o efeito negativo do Nimkol-L sobre esse processo, utilizando metodologia semelhante à do estudo de Neves et al. (2001).

Para avaliar o efeito na germinação dos conídios foram preparadas diluições do produto nas concentrações de 0; 0,2; 0,5; 1 e 5% i.a., em água destilada estéril com 0,01% de espalhante adesivo Tween 80. Conídios dos isolados de *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037) foram adicionados às diluições de Nimkol-L, procedendo-se à agitação. Uma hora depois, alíquotas de 0,1 ml de cada concentração foram espalhadas com alça de Drigalsky em placas de Petri com meio água-ágar 2%. As placas foram mantidas em B.O.D. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 12 horas) por 24 horas. Após esse período, avaliou-se a percentagem de conídios germinados, contando-se aleatoriamente, quatro vezes, 100 conídios por tratamento.

Os experimentos foram dispostos num arranjo inteiramente casualizado, submetendo-se posteriormente os resultados à análise de regressão polinomial, para obtenção das equações de melhor ajuste.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Crescimento de colônias e produção de conídios

Os testes de compatibilidade indicaram que o efeito do Nimkol-L sobre o crescimento vegetativo dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi dependente da concentração.

Quando o produto foi incorporado ao meio de cultura para os fungos, o crescimento das colônias não foi significativamente afetado na menor concentração testada (0,74% i.a.). Com o aumento da concentração, o crescimento vegetativo dos entomopatógenos foi menor até a completa inibição na maior concentração testada (18,4% i.a.) (Figura 1). A inibição completa dos fungos indica o alto poder fungicida do Nimkol-L, nessa concentração.

Quando o produto foi espalhado na superfície do meio de cultura, as concentrações avaliadas foram menores e, conseqüentemente, o efeito negativo sobre o crescimento vegetativo foi menor (Figura 2).

Para os dois isolados avaliados em ambos métodos de contato com o produto, houve resposta negativa em função da concentração do Nimkol-L, como indicado pelas equações de regressão. O efeito inibitório no crescimento das colônias foi maior quando o produto foi incorporado no meio de cultura, em função do contato dos fungos com maior quantidade do Nimkol-L.

Figura 1 - Diâmetro (mm) das colônias de *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037), cinco d.a.i., em diferentes concentrações de Nimkol-L adicionado ao meio de cultura BDA ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, fotofase 12 horas).

Figura 2 - Diâmetro (mm) das colônias de *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037), seis d.a.i., em diferentes concentrações de Nimkol-L adicionado na superfície do meio de cultura BDA ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, fotofase 12 horas).

O Nimkol-L afetou negativamente a conidiogênese de ambos isolados avaliados. O efeito foi evidente quando o produto foi incorporado no meio de cultura para os fungos. As equações de regressão polinomial de segundo grau não apresentaram bom ajuste com as curvas de inibição encontradas, tendo sido encontrado melhor ajuste com equações logarítmicas. A ação inibitória do Nimkol-L foi alta na concentração de 3,68% i.a. e total na concentração de 18,4% de i.a., para ambos os isolados (Figura 3).

Figura 3 - Conídios por colônia ($\times 10^7$) de *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037), cinco d.a.i., em diferentes concentrações de Nimkol-L adicionado ao meio de cultura BDA ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, fotofase 12 horas).

Quando o extrato foi espalhado na superfície do meio de cultura e, conseqüentemente houve menor contato dos entomopatógenos com o produto, a ação negativa sobre a produção de conídios foi menor (Figura 4). A equação de regressão de segundo grau apresentou bom ajuste tanto para *M. anisopliae* e como para *B. bassiana*. Da análise gráfica das curvas de resposta, pode-se observar uma tendência a uma maior ação inibitória do Nimkol-L sobre o isolado 1037 de *M. anisopliae* que sobre o 634 de *B. bassiana*.

Figura 4 - Conídios por colônia ($\times 10^7$) de *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037), seis d.a.i., em diferentes concentrações de Nimkol-L adicionado na superfície do meio de cultura BDA ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, fotofase 12 horas).

Em ensaios de laboratório, Aguda et al. (1986) determinaram redução na produção de conídios de *M. anisopliae* em contato com óleo de nim em concentrações de 5% ou superiores. O óleo de nim é usado, em aplicações de campo ou estufa, em concentrações entre 0,5 e 2% (Schmutterer, 1997). Vyas et al. (1992), por sua vez, não detectaram efeitos negativos da formulação comercial Neemark sobre o crescimento de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *B. browngniartii*.

4.3.2 Classificação da toxicidade do Nimkol-L para os fungos entomopatogênicos

A classificação do Nimkol-L, em relação à compatibilidade com os isolados dependeu da concentração do produto, de acordo com o índice T (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da compatibilidade do Nimkol-L com *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037) nas concentrações utilizadas.

ÍNDICE T PARA CLASSIFICAÇÃO DO NIMKOL-L, INCORPORADO NO MEIO BDA					
(% i.a.)	(ppm)	<i>M. anisopliae</i> 1037		<i>B. bassiana</i> 634	
		T	Classificação	T	Classificação
0	0	100,0	-	100,0	-
0,74	740	67,8¹	C²	71,8	C
1,84	1840	43,3	T	64,0	C
3,68	3680	15,8	MT	27,9	MT
18,4	18400	0,0	MT	0,0	MT

ÍNDICE T PARA CLASSIFICAÇÃO DO NIMKOL-L, ADICIONADO NA SUPERFÍCIE DO MEIO BDA					
(% i.a.)	(ppm)	<i>M. anisopliae</i> 1037		<i>B. bassiana</i> 634	
		T	Classificação	T	Classificação
0	0	100,0	-	100,0	-
0,2	200	97,6	C	97,6	C
0,5	500	71,2	C	72,2	C
1	1000	76,5	C	77,9	C
5	5000	43,6	T	44,7	T

¹ Índice T

² C = compatível; T = tóxico; MT = muito tóxico

Independentemente do método de incorporação do Nimkol-L no meio de cultura, a compatibilidade do Nimkol-L com os isolados testados diminuiu com o aumento da concentração do produto.

Até a concentração de 1% i.a. (1000 ppm), o produto foi compatível com ambos isolados. Entretanto, o Nimkol-L apresentou maior compatibilidade com o isolado 634 de *B. bassiana* que com o isolado 1037 de *M. anisopliae*, sendo compatível com aquele isolado na concentração de 1,84% i.a. (1840 ppm). Assim, o isolado 1037 de *M. anisopliae* apresentou-se mais sensível à ação tóxica do Nimkol-L.

Os presentes resultados diferem daqueles de Hirose et al.⁴, que estudaram o efeito *in vitro* do óleo de nim, na concentração de 2%, sobre os isolados CG 252 de *B. bassiana* (Embrapa - Cenargen) e CB 38 de *M. anisopliae* (Instituto Biológico de Campinas). Os autores constataram menor diâmetro das colônias e menor produção de conídios de *B. bassiana* CG 252 (-36,62% e -84,93%, respectivamente) do que de *M. anisopliae* CB 38 (-36,87% e -54,35%, respectivamente).

Tedders (1981), avaliando a inibição *in vitro* desses entomopatógenos com seis fungicidas, indicou que o enxofre e o zineb não inibiram o crescimento das colônias de *B. bassiana* em todas as concentrações testadas, e inibiram o crescimento de *M. anisopliae* na maior concentração. Contrariamente, o benomil inibiu mais o crescimento de *B. bassiana* do que de *M. anisopliae*.

Os resultados ressaltam a importância de avaliar a compatibilidade dos produtos a serem usados em forma conjunta, já que a mesma pode variar em função da espécie e isolado de entomopatógeno utilizado, assim como do princípio ativo e formulação do agrotóxico.

⁴ HIROSE, E.; NEVES, P.M. O.J.; ZEQUI, J.A.C.; MARTINS, L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO JR., A. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Em elaboração)

4.3.3 Germinação de conídios

O Nimkol-L afetou a germinação dos conídios de ambos os isolados apenas na maior concentração testada (5% i.a.). Os conídios germinaram de forma semelhante em contato com água destilada e com as concentrações menores (0,2 a 1% i.a.) do produto (Figura 5).

Os resultados de inibição da germinação dos conídios concorda com os resultados de crescimento de colônias e número de conídios por colônia, que indicaram inibição do crescimento dos entomopatógenos quando a maior concentração testada do produto foi incorporada no meio de cultura em que os fungos foram inoculados (Figuras 1 e 3). Entretanto, a concentração utilizada nessa situação foi maior (18,4%). O efeito de inibição do Nimkol-L na germinação dos conídios, na concentração de 5% i.a., foi maior que o efeito negativo sobre o crescimento vegetativo e a conidiogênese, observado quando o produto foi espalhado nessa concentração, na superfície do meio de cultura sólido.

Figura 5 - Germinação de conídios de *B. bassiana* (634) e *M. anisopliae* (1037), 24 horas após contato de uma hora com diferentes concentrações de Nimkol-L ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, fotofase 12 horas).

A ação fungicida de extratos e derivados do nim foi indicada para fungos fitopatogênicos (Grainge & Ahmed, 1988) bem como para fungos entomopatogênicos (Aguda et al., 1986). Entretanto, a ausência de inibição da germinação dos conídios pelo produto nas concentrações menores, indica a possibilidade de uso associado do Nimkol-L com os isolados avaliados, desde que colocados em quantidades compatíveis.

Hirose et al.⁴. determinaram ação inibitória do óleo de nim (2%) sobre a germinação dos conídios de *B. bassiana* CG 252 (-45,72%) e de *M. anisopliae* CB 38 (-17,42%).

Os presentes resultados são semelhantes aos obtidos por Rodríguez et al. (1997) com extrato aquoso de sementes de nim, que foi compatível com *B. bassiana* nas concentrações de 0,5; 1,5 e 2,5% para a germinação dos conídios. Porém, diferentemente do que foi observado com o crescimento do micélio do entomopatógeno (Figuras 1 e 3), esses autores não detectaram efeito negativo desse extrato em concentrações de até 5%.

4.4 Conclusões

O isolado 634 de *B. bassiana* é menos sensível ao Nimkol-L que o isolado 1037 de *M. anisopliae*.

In vitro, o Nimkol-L é compatível com *M. anisopliae* (1037) até 1% i.a. e com *B. bassiana* até 1,84% i.a.

Em concentrações de 5% i.a. ou maiores, o Nimkol-L reduz significativamente o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a germinação dos conídios de *M. anisopliae* (1037) e *B. bassiana* (634).

5 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS E DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *Heterotermes tenuis*

Resumo

Avaliou-se o efeito tóxico de derivados de meliáceas e dos isolados 634 de *Beauveria bassiana* e 1037 de *Metarhizium anisopliae* sobre *Heterotermes tenuis*, em laboratório. Foram testados extratos de *Melia azedarach*, *Trichilia pallida* e *Azadirachta indica* (nim) (1 e 5% p/v), óleo de nim (1 e 2% v/v) e Nimkol-L[®] (0,2 - 0,4% i.a., v/v), adicionados por imersão em discos de papelão. As suspensões de conídios (variando de 10^7 a 5×10^8 conídios/ml) foram pulverizadas sobre os cupins, no primeiro teste, e adicionadas por imersão dos discos, 24 horas, 5 e 6 dias após a adição dos extratos, nos demais testes. Com base nos resultados dos testes de laboratório, *M. anisopliae* (1037) e Nimkol-L foram utilizados em iscas Termitrap[®] para avaliar o efeito, em forma independente e associada, sobre focos de infestação de *H. tenuis* em cana-de-açúcar, em condições de campo. Os derivados vegetais, nas concentrações testadas, não ocasionaram mortalidade significativa de *H. tenuis*. *M. anisopliae* (1037) foi mais patogênico que *B. bassiana* (634) para esse cupim, em laboratório. A associação dos entomopatógenos com os extratos vegetais foi negativa, na maioria dos casos. Entretanto, houve aditividade e/ou sinergismo na associação dos entomopatógenos e Nimkol-L, quando foram adicionados nos discos com um mínimo de 24 horas de diferença. Quando incorporados nas iscas, em condições de campo, Nimkol-L, *M. anisopliae* (1037) e a associação de ambos confirmaram, para *H. tenuis*, a atividade tóxica verificada em laboratório.

Summary

The toxic effects of by-products of Meliaceae, isolate 634 of *Beauveria bassiana*, and isolate 1037 of *Metharhizium anisopliae*, on *Heterotermes tenuis* were measured in the laboratory. Extracts of *Melia azedarach*, *Trichilia pallida*, and *Azadirachta indica* (neem) (1 and 5% w/v), neem oil (1 and 2% v/v) and Nimkol-L® (0.2 - 0.4 a.i., v/v), were tested, added by immersion on paper disks. The conidial suspensions (varying from 10^7 to 5×10^8 conidia/ml) were sprayed over the termites in the first experiment, and added by immersion of the disks (24h, 5 and 6 days after the addition of the extracts) in the other experiments. Based on the results of the lab experiments, *M. anisopliae* (1037) and Nimkol-L were used in Termitrap® baits in order to test the effect, independently and in association, over infection cores of *H. tenuis* in sugarcane, under field conditions. The vegetal derivatives, in the tested concentrations, did not cause significant mortality of *H. tenuis*. *M. anisopliae* (1037) was more pathogenic than *B. bassiana* (634) for that termite in the laboratory. The association of the entomopathogens with the vegetal extracts was negative in most of the cases. There was additivity and/or synergism in the association of the entomopathogens and Nimkol-L when the disks were added with a difference of at least 24h. Nimkol-L, *M. anisopliae* (1037), and the combination of both, when incorporated in the baits, under field conditions, confirmed the toxic activity detected in the laboratory.

5.1 Introdução

O controle de *Heterotermes tenuis* é dificultado pelo hábito desses insetos que vivem em ninhos subterrâneos difusos, de difícil localização e que podem abrigar provavelmente grandes populações.

O uso de iscas atrativas constitui uma estratégia particularmente interessante porque utiliza-se uma pequena quantidade de inseticida e,

necessita que apenas uma proporção da população entre em contato com o agente tóxico para que ocorra distribuição entre os habitantes da colônia (Delate et al., 1995).

Su et al. (1987) sugeriram que a utilização de inseticidas não repelentes e de ação lenta é ideal, com base na premissa de que uma parte da colônia pode ser contaminada e o efeito tóxico distribuído na colônia através das interações sociais dos cupins subterrâneos.

O emprego de fungos entomopatogênicos nas iscas constitui uma estratégia de introdução inoculativa que visa a transmissão da doença por parte dos indivíduos que se alimentam nas iscas para o resto da colônia, como observado por Kramm et al. (1982), em laboratório. Segundo Almeida (1994), essa estratégia é favorecida pelo comportamento de *H. tenuis*, que não detecta os conídios de alguns isolados de fungos entomopatogênicos.

A associação de fungos entomopatôgenos com inseticidas seletivos em concentrações sub-letais pode provocar um efeito sinérgico sobre a praga. Assim, a utilização de iscas atrativas com entomopatógenos associados a tóxicos compatíveis pode viabilizar o uso desses microrganismos, tornando as aplicações mais eficientes e econômicas (Alves et al., 1998).

Moino Júnior & Alves (1998) verificaram que o inseticida imidacloprid, em concentrações subletais, alterou a capacidade de limpeza de *H. tenuis*, que apresentaram, no tegumento, maior número de conídios dos fungos entomopatogênicos inoculados.

Alguns extratos vegetais agem lentamente, não apresentando toxicidade aguda, como constatado para o óleo de nim e *Reticulitermes speratus* (Serit et al., 1992a). Esse modo de ação é apropriado para a estratégia de iscas atrativas, na qual o objetivo é uma baixa mortalidade de insetos forrageadores e uma alta eficiência de controle na colônia, se possível, como consequência do efeito sinérgico entre o agente tóxico e os entomopatógenos utilizados em forma associada.

Dessa forma, no presente trabalho, estudou-se o efeito associado de derivados de meliáceas e isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre o cupim subterrâneo *H. tenuis*.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Efeito associado de derivados de meliáceas e fungos entomopatogênicos sobre *H. tenuis* em laboratório

Os estudos para avaliar o efeito associado de extratos vegetais e os fungos entomopatogênicos foram desenvolvidos nos laboratórios de Patologia de Insetos e Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, em condições controladas de temperatura e fotoperíodo.

Os extratos e derivados vegetais selecionados e avaliados nos diferentes bioensaios foram: óleo de nim (1 e 2% v/v), Nimkol-L[®] (0,2; 0,3 e 0,4% i.a. v/v), extrato de folhas de *Melia azedarach* (1 e 5% p/v), infusão de sementes de nim (5% p/v), extrato de frutos verdes de *Trichilia pallida* (1 e 5% p/v). Os referidos produtos foram adicionados em discos de papelão (5 cm de diâmetro) por meio de imersão em suspensão aquosa. No tratamento testemunha, os discos de papelão foram imersos em água destilada. Dois discos por parcela foram dispostos em placas de plástico de 6 cm de diâmetro, com orifícios para troca de ar na metade superior.

No primeiro teste, 28 operários e 2 soldados de *H. tenuis* por repetição, coletados em armadilhas de papelão corrugado, foram inoculados com suspensão de conídios dos isolados 634 de *Beauveria bassiana* e 1037 de *Metarhizium anisopliae*, nas concentrações de 10^7 e 5×10^8 conídios/ml. Os insetos foram transferidos para as placas com os discos de papelão previamente tratados com os derivados vegetais e os conjuntos mantidos em B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$; $65 \pm 15\%$ U.R; escotofase contínua).

Nos bioensaios restantes, com o intuito de representar as condições de emprego na prática, em iscas de papelão, as suspensões de conídios dos entomopatógenos foram adicionadas aos discos de papelão por imersão. No primeiro teste conduzido dessa forma, a adição das suspensões de conídios foi realizada duas horas após a incorporação dos extratos. Nos três bioensaios subseqüentes, a adição da suspensão conidial (na concentração de 10^7 e 10^8 conídios/ml) realizou-se um, seis e cinco dias após a incorporação dos extratos, respectivamente. Para manutenção da umidade, diariamente, eram adicionadas duas a quatro gotas de água destilada num cilindro de algodão de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro x 0,5 cm de comprimento, dentro da caixa plástica. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente, retirando-se os indivíduos mortos.

Os tratamentos foram constituídos pelo fatorial entomopatógenos x derivados vegetais, mais uma testemunha tratada apenas com água, em experimentos com delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos constaram de três ou quatro repetições com 24 a 28 operários e 1 ou 2 soldados de *H. tenuis* cada, dependendo do bioensaio. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para apresentação gráfica, foram selecionados os resultados de análise estatística do último dia de avaliação de cada experimento e resultados relativos a períodos intermediários nos quais ocorreram diferenças na velocidade de ação dos tratamentos. Os resultados das análises estatísticas gerais foram incluídos no Apêndice.

5.2.2 Efeito de Nimkol-L e fungos entomopatogênicos sobre *H. tenuis* em condições de campo

O estudo do efeito associado do Nimkol-L com o isolado 1037 de *M. anisopliae* foi desenvolvido no campo de produção de cana-de-açúcar da Fazenda São José, município de Rio Claro (SP), pertencente à Usina São João, Araras (SP).

Inicialmente, em uma área de 100m x 200m em um talhão mantido sem adição de agrotóxicos, foram dispostas iscas Termitrap[®], a cada 10 m para detectar e monitorar focos de atividade de *H. tenuis*. As iscas foram identificadas com estacas e elaborou-se um mapa dos locais, indicando os focos com e sem presença de indivíduos da espécie.

A recuperação e substituição de iscas foi realizada 15 dias depois, avaliando-se, visualmente, no laboratório a presença de cupins. O número de insetos nas iscas recuperadas do campo foi estimado segundo três categorias: 0, 250 a 500 e >500 indivíduos. Os tratamentos foram instalados nos locais onde foram recuperadas iscas com mais de 500 cupins .

Dos locais selecionados foram separadas amostras de 50 indivíduos para testes de antagonismo em laboratório, com o objetivo de identificar cinco focos de infestação no campo, presumivelmente, pertencentes a colônias diferentes. Segundo Andrews (1911), apesar de algumas exceções, uma das ações mais certas dos cupins é atacar indivíduos de outras colônias. A intensidade da agressão varia de uma família a outra de cupins, mas parece ser bem desenvolvida nos rinotermitídeos, segundo Howick & Creffield (1980). Os indivíduos pertencentes a dois grupos diferentes, quando morrem no período de 24 horas depois de serem colocados numa mesma placa, podem ser considerados como provenientes de colônias diferentes, embora segundo Camargo-Dietrich & Costa-Leonardo (2000), os fatores que governam o comportamento antagonístico de *H. tenuis* sejam complexos e dependentes de fatores ambientais e características individuais. Esses autores consideraram

positivo o antagonismo quando mais da metade dos indivíduos originais morreram ou ficaram feridos 17 horas após o início do teste.

Nos cinco focos selecionados, pertencentes teoricamente a colônias diferentes, dispuseram-se cinco tratamentos: 1) testemunha, 2) Nimkol-L 0,3% i.a. (v/v), 3) *M. anisopliae* isolado 1037, 4) Nimkol-L 0,3% i.a. + *M. anisopliae* isolado 1037, 5) *M. anisopliae* isolado 1037 + fipronil (Regent® 800 WG) 0,003%. Esse último tratamento foi estabelecido como padrão de controle, já que foi o inseticida que apresentou o melhor controle de *H. tenuis* dentre vários produtos testados por Macedo et al. (1997). O Nimkol-L foi selecionado em função dos resultados obtidos nos testes de associação com os entomopatógenos em laboratório (item 5.3.1).

Em cada foco foram dispostos cinco conjuntos de duas iscas, uma previamente tratada com o(s) produto(s) e uma não tratada (branca). O arranjo, no campo, foi um conjunto central e quatro eqüidistantes do central, separados 10m entre si (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição das iscas nos pontos de amostragem no campo. (Fazenda São José, município de Rio Claro, SP, pertencente à Usina São João, Araras SP).

O Nimkol-L e o fipronil foram impregnados nas iscas por imersão, durante 90 segundos, em 2,5 litros, escoando-se em seguida a solução excedente e deixando as iscas para secagem ao ar, em laboratório. Os fungos foram

impregnados com pincel 24 horas após a adição dos produtos, dentro de câmara de fluxo laminar vertical, na dose de aproximadamente 0,5g de conídios puros por isca.

Todas as iscas dos cinco locais foram monitoradas e substituídas aos 15, 35, 60, 85, 110 e 130 dias. O número total de cupins capturados em cada isca, data e ponto de amostragem constam do Apêndice.

O número de insetos obtidos em cada isca foi estimado por peso. Para tanto, foram pesadas alíquotas de números conhecidos de cupins. Depois da pesagem, o total de insetos foi mantido em placas de Petri (15 cm de diâmetro) em laboratório durante seis dias, para avaliação da mortalidade residual. Em cada placa, adicionou-se papelão não tratado como alimento e um cilindro de algodão (0,5 x 0,5 cm) para adição diária de água destilada. Ao término desse período, a mortalidade foi avaliada por peso e por estimativa de número, por meio da pesagem de alíquotas de indivíduos mortos e vivos. As coletas da última amostragem foram mantidas nas placas no laboratório até a morte do total dos indivíduos de todos os tratamentos, com o objetivo de avaliar o tempo máximo de sobrevivência nestas condições.

Os resultados foram analisados apenas descritivamente, porque foi estabelecida somente uma repetição por tratamento.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Efeito associado de derivados de meliáceas e fungos entomopatogênicos sobre *H. tenuis* em laboratório

Quando a suspensão de conídios foi pulverizada sobre os insetos, e esses foram depois colocados nos recipientes com discos de papelão

previamente imersos nos derivados vegetais, observou-se maior mortalidade dos insetos pelo isolado 1037 de *Metarhizium anisopliae* do que com o isolado 634 de *Beauveria bassiana*, nas duas concentrações testadas. A mortalidade provocada pelos derivados vegetais foi menor que 20% até o final do período de avaliação (Figuras 2 e 3). Os resultados apresentados nas Figuras 2 e 3 podem ser comparados entre si já que foram obtidos num mesmo experimento. Assim, pode-se confirmar a maior eficiência dos entomopatógenos em geral, quando comparados com os derivados vegetais e do isolado 1037 de *M. anisopliae* em comparação com o isolado 634 de *B. bassiana*. O isolado 634 de *B. bassiana* foi selecionado como um dos isolados mais eficientes para o controle dessa espécie por Almeida et al. (1997). O isolado 1037 de *M. anisopliae* destacou-se pela patogenicidade para *H. tenuis* (Lopes⁵).

Os tratamentos de associação dos derivados vegetais com os fungos entomopatogênicos tenderam a superar a eficiência dos tratamentos isolados no caso de *B. bassiana* 634 na menor concentração de conídios (10^7 conídios/ml). Quando a associação foi com o Nimkol-L, a tendência à maior eficiência foi também observada com a maior concentração do fungo (5×10^8 conídios/ml). (Figura 5.2). Moino Júnior (1998) explicou a maior eficiência de controle do isolado E-9 de *M. anisopliae*, por um adiantamento das fases de penetração, colonização e conidiogênese, em comparação ao isolado 634 de *B. bassiana*.

⁵ LOPES, R.B. (ESALQ/USP). Comunicação pessoal, 1999.

MAFO = extrato aquoso de folhas de *Melia azedarach* 5%; NO = Óleo de nim 2%; NK = Nimkol 0,2% i.a.; Bb1 = *Beauveria bassiana* 634 10^7 conídios/ml; Bb2 = *B. bassiana* 634 5×10^8 conídios/ml.

Figura 2 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* pulverizados com conídios de *Beauveria bassiana* (634) e alimentados em discos de papelão tratados com derivados de meliáceas.

Também houve tendência de aumento da eficiência do isolado 1037 de *M. anisopliae* quando associado com o Nimkol-L e com o extrato de folhas de *M. azedarach*. Na maior concentração do fungo (5×10^8 conídios/ml), essa tendência de aumento de mortalidade foi observada no 2º dia de avaliação (Figura 3).

MAFO = extrato aquoso de folhas de *Melia azedarach* 5%; NO = Óleo de nim 2%; NK = Nimkol 0,2 i.a.%; Ma1 = *Metarhizium anisopliae* 1037 10^7 conídios/ml; Ma2 = *M. anisopliae* 1037 5×10^8 conídios/ml.

Figura 3 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* pulverizados com conídios de *Metarhizium anisopliae* (1037) e alimentados em discos de papelão tratados com derivados de meliáceas.

A associação dos isolados com o óleo de nim foi negativa, na maior concentração do isolado 634 de *B. bassiana* (5×10^8 conídios/ml) e na menor concentração de *M. anisopliae* 1037 (10^7 conídios/ml).

Em nenhum caso, a interação de entomopatógenos e derivados vegetais foi significativa, de acordo com a análise de variância.

Quando as suspensões de conídios foram adicionadas por imersão aos discos de papelão previamente tratados com os derivados vegetais, a associação teve um efeito geral negativo. O efeito foi significativo no 4º dia de avaliação para os três derivados vegetais testados e a concentração menor de *B. bassiana* 634 (10^7 conídios/ml), e para o óleo de nim na concentração maior do entomopatógeno (5×10^8 conídios/ml). (Figura 4)

NK = Nimkol 0,2% i.a.; ON = Óleo de nim 5%; INF.SN = Infusão de sementes de nim 5%; Bb1 = *Beauveria bassiana* 634 10^7 conídios/ml; Bb2 = *B. bassiana* 634 5×10^8 conídios/ml.

Figura 4 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentados em discos de papelão tratados com derivados de meliáceas e conídios de *Beauveria bassiana* (634).

No 4º dia de avaliação, também foi detectado efeito negativo dos três derivados vegetais sobre a eficiência de *M. anisopliae* 1037, na concentração de 10^7 conídios/ml (Figura 5).

NK = Nimkol 0,2% i.a.; ON = Óleo de nim 5%; INF.SN = Infusão de sementes de nim 5%; Ma1 = *Metarhizium anisopliae* 1037 10^7 conídios/ml.

Figura 5 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentados em discos de papelão tratados com derivados de meliáceas e conídios de *Metarhizium anisopliae* (1037).

O efeito fungitóxico do Nimkol-L sobre *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi evitado, inoculando-se os conídios, decorridas 24 horas da impregnação do referido produto nos discos de papelão. Com esse procedimento, constatou-se efeito positivo da associação do extrato com os entomopatógenos. A associação do Nimkol-L, nas duas concentrações testadas (0,2 e 0,4% i.a.), melhorou a eficiência do isolado 634 de *B. bassiana*, principalmente na menor concentração avaliada (10^7 conídios/ml). O efeito positivo da associação foi significativo nos 5º, 6º e 7º dias de avaliação (Figura 6).

NK = Nimkol; Bb107 = *Beauveria bassiana* 634 10^7 conídios/ml; Bb108 = *B. bassiana* 634 10^8 conídios/ml.

Figura 6 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentados em discos de papelão tratados com Nimkol-L e conídios de *Beauveria bassiana* (634).

Tendência semelhante foi observada no 3º e no 4º dia da avaliação para o isolado 1037 de *M. anisopliae* na maior concentração (10^8 conídios/ml) e no 5º e no 6º dia de avaliação na menor concentração (10^7 conídios/ml) (Figura 7).

Confirmou-se nestes testes a maior eficiência do isolado 1037 de *M. anisopliae* que do isolado 634 de *B. bassiana*, em relação à mortalidade de *Heterotermes tenuis*. A associação com os derivados vegetais indicou uma tendência geral à maior compatibilidade do isolado 634 de *B. bassiana* em comparação ao 1037 de *M. anisopliae*, fato que concorda com os resultados dos testes de compatibilidade *in vitro* (Capítulo 2.4).

NK = Nimkol; Ma107 = *Metarhizium anisopliae* 1037 10^7 conídios/ml; Ma108 = *M. anisopliae* 1037 10^8 conídios/ml.

Figura 7 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentados em discos de papelão tratados com Nimkol-L e conídios de *Metarhizium anisopliae* (1037).

Quando foi avaliada a associação do Nimkol-L e o isolado 1037 de *M. anisopliae*, em diferentes concentrações, observou-se uma resposta dependente da concentração dos componentes da associação. O Nimkol-L provocou um efeito inibitório significativo sobre o entomopatógeno na concentração de 1×10^6 conídios/ml. O efeito, embora não significativo, foi positivo quando a associação do Nimkol-L foi realizada com concentrações maiores do fungo. O entomopatógeno na concentração de 10^7 conídios/ml, quando associado ao Nimkol-L, apresentou tendência de provocar maior mortalidade de *H. tenuis*. Já na concentração de 10^8 conídios/ml, o entomopatógeno sozinho ou associado às diferentes concentrações do Nimkol-L provocou mortalidade de 100% dos cupins. Entretanto, a tendência foi de atingir essa mortalidade total antes nos tratamentos do entomopatógeno associado ao Nimkol-L (Figura 8).

NK = Nimkol; Ma106 = *Metarhizium anisopliae* 10371x10⁶ conídios/ml; Ma107 = *M. anisopliae* 1037 10⁷ conídios/ml; Ma108 = *M. anisopliae* 1037 10⁸ conídios/ml.

Figura 8 - Mortalidade acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentados em discos de papelão tratados com Nimkol-L e conídios de *Metarhizium anisopliae* (1037).

A adição dos entomopatógenos seis dias após os operários terem sido colocados para se alimentar dos discos de papelão com os derivados vegetais, indicou interação entre alguns tratamentos. Na mortalidade avaliada desde a adição dos derivados e apresentada a partir da adição dos entomopatógenos (Figuras 9 e 10), determinou-se ação positiva da associação destes com o Nimkol-L e negativa com o óleo de nim e o extrato aquoso de folhas de *M. azedarach*.

Devido ao fato de os tratamentos Nimkol-L, *M. anisopliae* (1037) e *B. bassiana* (634) terem atingido níveis de mortalidade diferentes no momento de adição dos fungos, não é possível identificar se o aumento da mortalidade observado posteriormente foi de aditividade ou sinergismo. Entretanto, a magnitude das diferenças sugerem um efeito aditivo. A mortalidade provocada pela associação do fungo e o Nimkol-L foi significativamente maior do que a ação do isolado 634 de *B. bassiana* nos três primeiros dias de avaliação para a concentração de 10^7 conídios/ml e nos últimos quatro para a concentração de 10^8 conídios/ml. Já para o isolado 1037 de *M. anisopliae*, a associação do fungo com o Nimkol-L resultou significativamente positiva no primeiro dia de avaliação, para a concentração de 10^7 conídios/ml e nos três primeiros dias de avaliação para a concentração de 10^8 conídios/ml.

A associação dos fungos com o óleo de nim e com o extrato aquoso de folhas de *M. azedarach* foi, em termos gerais, negativa. Em todos os casos, a mortalidade de *H. tenuis* provocada pelos isolados, em forma independente, foi igual ou maior que a provocada pela associação destes com os derivados vegetais. O efeito negativo foi estatisticamente significativo para o isolado 634 de *B. bassiana* na concentração maior (10^8 conídios/ml), no último dia de avaliação. Para o isolado 1037 de *M. anisopliae*, o efeito negativo da associação com esses derivados vegetais também foi constatado na maior concentração do fungo (10^8 conídios/ml), e foi significativo no 2º dia de avaliação na associação com o óleo de nim e no segundo e no 3º dia de avaliação para o extrato de folhas de *M. azedarach*.

TEST. = Testemunha; Bb107 = *Beauveria bassiana* 634 10^7 conídios/ml; Bb108 = *B. bassiana* 634 10^8 conídios/ml; Óleo = Óleo de nim 2%; Nk = Nimkol 0,2% i.a.; MAFO = Extrato aquoso de *Melia azedarach* 5%

Figura 9 - Mortalidade de *Heterotermes tenuis* depois de seis dias de alimentação com discos tratados com derivados vegetais ou água destilada, momento em que foram adicionadas as suspensões de conídios de *Beauveria bassiana* (634).

TEST. = Testemunha; Ma107 = *Metarhizium anisopliae* 1037 10^7 conídios/ml; Ma108 = *M. anisopliae* 1037 10^8 conídios/ml; Óleo = Óleo de nim 2%; Nk = Nimkol 0,2% i.a.; MAFO = Extrato aquoso de *Melia azedarach* 5%

Figura 10 - Mortalidade de *Heterotermes tenuis* depois de seis dias de alimentação com discos tratados com derivados vegetais ou água destilada, momento em que foram adicionadas as suspensões de conídios de *Metarhizium anisopliae* (1037).

Para tentar identificar sinergismo na associação entre os entomopatógenos e os derivados vegetais, no seguinte experimento avaliou-se a mortalidade adicional sobre os indivíduos sobreviventes depois da alimentação com os discos tratados com os derivados vegetais, a partir do momento da adição dos entomopatógenos (Figuras 11 e 12).

Foram verificadas as tendências gerais do ensaio prévio, já que apenas a associação dos entomopatógenos com o Nimkol-L resultou positiva. Essa associação resultou significativa apenas com o isolado 1037 de *M. anisopliae* e no último dia de avaliação. O óleo de nim (1%), o extrato de aquoso folhas de *M. azedarach* (1%) e o extrato aquoso de frutos verdes de *T. pallida* (1%) não adicionaram qualquer vantagem à eficiência dos isolados dos patógenos. Adicionalmente, confirmou-se a tendência de associação negativa destes derivados com os entomopatógenos, embora o efeito não tenha sido significativo.

A ação positiva da associação entre o Nimkol-L e o isolado 1037 de *M. anisopliae* indica a ocorrência de sinergismo, já que o efeito do entomopatógeno e do extrato associados tendeu a ser maior que o somatório do efeito de ambos, empregados isoladamente.

Em termos gerais, os derivados vegetais, nas concentrações testadas, determinaram índices de mortalidade menores que 30% em *H. tenuis*, nos testes de laboratório, com exceção do Nimkol-L 0,4% i.a., que provocou aproximadamente 70% de mortalidade em um dos testes. Esses níveis de mortalidade, entretanto poderiam representar uma situação de estresse dos insetos, favorável a uma maior eficiência dos entomopatógenos, quando utilizados em forma associada.

Moino Júnior & Alves (1998) observaram alteração dos hábitos de limpeza de *H. tenuis*, quando afetados por imidacloprid em concentrações subletais. Quando os insetos foram contaminados pelo inseticida, houve diminuição da eficiência da limpeza, para eliminação do inóculo dos patógenos, constatada pelo maior número de conídios presentes na superfície do corpo.

NOTA: A testemunha teve mortalidade 0 a partir do dia 1.

nimkol = Nimkol 0,4% i.a.; óleo = Óleo de nim 1%; 634 = *Beauveria bassiana* 634 5×10^7 conídios/ml; 1037 = *Metarhizium anisopliae* 1037 5×10^7 conídios/ml.

Figura 11 - Mortalidade de *Heterotermes tenuis* a partir da adição das suspensões de conídios dos entomopatógenos, depois de seis dias de alimentação com discos tratados com derivados de nim ou água destilada.

NOTA: A testemunha teve mortalidade 0 a partir do dia 1.

TPFV5 = Extrato aquoso de frutos verdes de *Trichilia pallida* 5%; MAFO = Extrato aquoso de folhas de *Melia azedarach* 1%; 634 = *Beauveria bassiana* 634 5×10^7 conídios/ml; 1037 = *Metarhizium anisopliae* 1037 5×10^7 conídios/ml.

Figura 12 - Mortalidade de *Heterotermes tenuis* a partir da adição das suspensões de conídios dos entomopatógenos, depois de seis dias de alimentação com discos tratados com extratos vegetais ou água destilada.

Entretanto, o comportamento de limpeza pode representar uma fonte de infecção dos indivíduos que efetuam-na, como demonstrado por Kramm et al. (1982). Esses autores indicaram que cupins do gênero *Reticulitermes* cobertos com conídios de *M. anisopliae* foram limpados mais extensivamente que os não expostos ao fungo. A observação direta mostrou que os insetos que efetuavam a limpeza ingeriram conídios, ocorrendo alta taxa de mortalidade entre eles.

Kramm & West (1982) demonstraram que numerosos conídios mantêm a viabilidade após a passagem pelo trato digestivo dos cupins subterrâneos. Os autores salientam a importância epizootiológica desse evento.

No presente estudo, destaca-se que a ação dos derivados vegetais foi negativa sobre os entomopatógenos. Essa ação inibitória foi dependente do derivado vegetal, da concentração de ambos componentes da associação (derivado vegetal e isolado), da forma de aplicação dos produtos e do tempo de espera entre a aplicação dos derivados vegetais e das suspensões de conídios dos entomopatógenos.

A seleção da concentração do extrato vegetal e do tempo de espera entre a aplicação de ambos produtos nos discos de papelão permitiu solucionar problemas de inibição dos entomopatógenos e observar associações que indicaram aditividade e sinergismo entre ambos componentes da associação, no caso do Nimkol-L.

O isolado 1037 de *M. anisopliae* foi mais patogênico para *H. tenuis* do que o isolado 634 de *B. bassiana*. Como contrapartida, o isolado 634 de *B. bassiana* foi comparativamente menos sensível à ação inibitória dos derivados vegetais, para o conjunto de experimentos realizados. Moino Júnior & Alves (1998), determinaram que o isolado E9 de *M. anisopliae* também foi mais eficiente para *H. tenuis*. O autor verificou, para esse isolado, adiantamento das fases de penetração, colonização e conidiogênese, que refletiram em maior rapidez na mortalidade do cupim. Adicionalmente, o autor observou que *M. anisopliae* (E9) foi mais compatível com fipronil e imidacloprid que o isolado 634 de *B. bassiana*.

5.3.2 Efeito do Nimkol-L e fungos entomopatogênicos sobre *Heterotermes tenuis* em condições de campo.

A recuperação seqüencial de iscas da área de amostragem indicou que houve uma tendência de aumento do número de iscas testemunha com *H. tenuis* ao longo do período de avaliação. Essa tendência foi observada também nas iscas brancas dos pontos de amostragem do tratamento Nimkol-L + *M. anisopliae* 1037 e fipronil + *M. anisopliae* 1037. Nos demais locais de amostragem a tendência do número de iscas com presença de cupins foi de estabilidade ou redução (Figura 13).

Quando analisado o número de indivíduos capturados nas iscas em cada período de amostragem observou-se diminuição no número total e médio de indivíduos por isca apenas nos pontos de amostragem de iscas tratadas com Nimkol-L e com *M. anisopliae* 1037. Para o tratamento com o fungo, essa tendência foi também confirmada nas iscas brancas (Figura 13).

Já o tratamento com fipronil + *M. anisopliae* 1037 foi o único que apresentou uma evolução ascendente do número total e médio de indivíduos nas iscas brancas correspondentes a esse ponto de amostragem. Ao longo do período de avaliação, não foi detectada a presença de cupins nas iscas tratadas com essa associação de produtos. Isso poderia indicar duas alternativas: o produto, na concentração utilizada, foi repelente para o inseto ou então a eficiência de controle na isca foi alta o suficiente para não permitir sobrevivência de indivíduos nas mesmas. Entretanto, a primeira das opções parece ser mais provável já que não foram detectados sinais de dano nas iscas ou sinais da presença do inseto em qualquer período. Por outro lado Macedo⁶ já observou repelência do fipronil para *H. tenuis* em iscas no campo.

⁶ MACEDO, D. (ESALQ/USP) Comunicação pessoal, 2001.

TEST. = Testemunha; NK-NK = Iscas com Nimkol; NK-BR = Iscas brancas do tratamento Nimkol; Ma-Ma = Iscas com *Metarhizium anisopliae* 1037; Ma-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037; MaRg-MaRg = Iscas com *M. anisopliae* 1037 + Regent (Fipronil); MaRg-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037 + Regent; MaNK-MaNK = Iscas com *M. anisopliae* 1037 + Nimkol; MaNK-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037 + Nimkol.

Figura 13 - Número de iscas com cupins, número total de cupins nas iscas e número médio de cupins por isca, para as iscas tratadas e brancas correspondentes aos tratamentos, em seis datas de amostragem.

No tratamento de associação do entomopatógeno com Nimkol-L, o número médio de cupins por isca e o número total capturado nas mesmas tenderam a aumentar na primeira metade do período de avaliação, aproximadamente, e a diminuir nos últimos períodos de amostragem.

Em termos gerais, em todos os tratamentos observou-se maior captura de indivíduos nas iscas brancas que acompanharam os tratamentos do que nas iscas tratadas com os produtos.

As observações realizadas em laboratório com os indivíduos capturados nas iscas permitiram avaliar o efeito residual dos produtos utilizados nos pontos de amostragem. Em termos gerais, observou-se maior mortalidade dos indivíduos provenientes de iscas tratadas com os diferentes produtos que aqueles provenientes das iscas brancas correspondentes a cada tratamento, após seis dias no laboratório (Figura 14).

A mortalidade dos indivíduos provenientes das iscas brancas do tratamento fipronil + *M. anisopliae* 1037 foi semelhante à mortalidade dos provenientes do ponto de amostragem onde localizou-se a testemunha (12,8% e 10,1%, respectivamente). A mortalidade dos indivíduos provenientes das iscas brancas do ponto de amostragem dos tratamentos com *M. anisopliae* 1037, com Nimkol-L e a associação de ambos foi aproximadamente o dobro da constatada na testemunha (21,7%, 24,1% e 20,1%, respectivamente). Finalmente, os indivíduos provenientes das iscas tratadas com esses tratamentos atingiram uma mortalidade entre cinco e seis vezes a mortalidade na testemunha (60,8% , 52,4% e 51,0%, respectivamente).

TEST. = Testemunha; NK-NK = Iscas com Nimkol®; NK-BR = Iscas brancas do tratamento Nimkol®; Ma-Ma = Iscas com *Metarhizium anisopliae* 1037; Ma-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037; MaRg-MaRg = Iscas com *M. anisopliae* 1037 + fipronil; MaRg-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037 + fipronil; MaNK-MaNK = Iscas com *M. anisopliae* 1037 + Nimkol®; MaNK-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037 + Nimkol®.

Figura 14 – Mortalidade, no laboratório, de *Heterotermes tenuis* provenientes das iscas do campo, segundo tratamento, após seis dias de alimentação em discos de papelão não tratados (média de seis amostragens).

No geral, não é possível concluir que tenha ocorrido eficiência de controle para algum dos tratamentos no campo. O tamanho das colônias era desconhecido, não estimado e os tratamentos foram estabelecidos para monitorar as tendências no número de indivíduos capturados. Não é possível conhecer o número de iscas que seria necessário dispor no campo para tentar

eliminar a população correspondente a cada colônia teórica que representou cada ponto de amostragem. Segundo Almeida (1998), porém, o método de controle com iscas (*slow-acting*), utilizando fipronil 0,003% associado ao fungo *B. bassiana* conseguiu reduzir a população de *H. tenuis* em cana-de-açúcar, em qualquer época do ano.

A sobrevivência dos indivíduos capturados na última amostragem confirmou o efeito residual dos tratamentos das iscas. Os insetos provenientes das iscas brancas do tratamento fipronil + *M. anisopliae* 1037 sobreviveram um tempo semelhante ao dos insetos provenientes das iscas da testemunha (Figura 15).

Também os insetos capturados nas iscas brancas dos tratamentos Nimkol-L, *M. anisopliae* 1037 e *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L apresentaram uma sobrevivência semelhante com a dos cupins provenientes da testemunha, mas nos tratamentos com o extrato vegetal houve menor tempo de sobrevivência. Os menores tempos de sobrevivência no laboratório foram observados nos indivíduos provenientes das iscas tratadas com *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L, Nimkol-L e *M. anisopliae* 1037, em ordem decrescente (Figura 15).

A mortalidade observada em laboratório, assumida como efeito residual dos tratamentos, permite verificar uma ação do isolado 1037 de *M. anisopliae* e da sua associação com o Nimkol-L semelhante à observada nos testes de laboratório. Embora menores que os efeitos observados em laboratório, os níveis de mortalidade residual dos indivíduos trazidos do campo são promissores, ainda que, segundo Hall (1994), muitas vezes os resultados do controle microbiano obtidos em laboratório não sejam repetidos em testes de campo.

TEST. = Testemunha; NK-NK = Iscas com Nimkol-L; NK-BR = Iscas brancas do tratamento Nimkol-L; Ma-Ma = Iscas com *Metarhizium anisopliae* 1037; Ma-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037; MaRg-MaRg = Iscas com *M. anisopliae* 1037 + fipronil; MaRg-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037 + fipronil; MaNK-MaNK = Iscas com *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L; MaNK-BR = Iscas brancas do tratamento *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L.

Figura 15 - Sobrevivência (dias) de *Heterotermes tenuis* no laboratório após coleta das iscas do campo, segundo tratamento, na última data de amostragem.

A mortalidade dos indivíduos capturados nas iscas brancas dos tratamentos sugere também essa ação residual dos produtos utilizados e que houve visita dos insetos às iscas tratadas e não tratadas.

A ação isolada do Nimkol-L foi melhor do que o esperado em função dos resultados de laboratório com concentrações variáveis entre 0,2 e 0,4% i.a. e pela ausência de transferência do produto entre indivíduos.

5.4 Conclusões

O isolado 1037 de *M. anisopliae* é mais virulento para *H. tenuis* que o isolado 634 de *B. bassiana*.

A associação dos fungos entomopatogênicos com o Nimkol-L, é mais eficiente que os tratamentos separadamente, sob determinadas condições de aplicação.

Os demais extratos vegetais testados, em geral, afetam a eficiência biológica dos entomopatógenos em relação a *H. tenuis*. O óleo de nim e o extrato de folhas de *M. azedarach* reduzem a eficiência biológica dos entomopatógenos em relação a *H. tenuis*.

As observações de mortalidade, em laboratório, de cupins capturados em iscas tratadas, confirmam a eficiência do Nimkol-L, do isolado 1037 de *M. anisopliae* e da associação de ambos, em condições de campo.

6 CONCLUSÕES GERAIS

. O Nimkol-L, à base de folhas de nim, apresenta atividade biológica em relação a *H. tenuis*, causando mortalidade significativa a partir do 3º dia, nas concentrações de 0,5 e 1% i.a. A sobrevivência desse cupim não é significativamente afetada pelos extratos aquosos de folhas de nim, de *Melia azedarach* e de *Trichilia pallida* e o óleo de nim.

. Os derivados vegetais não são repelentes para *H. tenuis*, em testes com chance de escolha em recipientes sem ágar, com exceção do extrato de folhas de nim (5%) que, nesse substrato, é repelente ao cupim.

. Em placas com ágar, *H. tenuis* não fecha e nem abandona as galerias construídas para evitar o contato com os produtos testados.

. Não há evidências de transmissão dos ingredientes ativos de Nimkol-L entre indivíduos.

. *In vitro*, o isolado 634 de *B. bassiana* é menos afetado pelo Nimkol-L que o isolado 1037 de *M. anisopliae*. O Nimkol-L é compatível com *M. anisopliae* (1037) até 1% i.a. e com *B. bassiana* até 1,84% i.a.

. O Nimkol-L reduz significativamente o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a germinação dos conídios de *M. anisopliae* (1037) e *B. bassiana* (634), em concentrações de 5% i.a. ou maiores,.

. O isolado 1037 de *M. anisopliae* é mais patogênico para *H. tenuis* que o isolado 634 de *B. bassiana*.

. A associação dos fungos entomopatogênicos com o Nimkol-L, quando a aplicação da suspensão de conídios é realizada no mínimo 24 horas após a aplicação do derivado vegetal, é mais eficiente que a ação de ambos isoladamente. Os demais extratos vegetais não são apropriados para a associação com os entomopatógenos. Particularmente o óleo de nim e o extrato de folhas de *M. azedarach* reduzem a eficiência biológica dos entomopatógenos em relação a *H. tenuis*.

. O Nimkol-L, o isolado 1037 de *M. anisopliae* e a associação de ambos, afetam a sobrevivência de *H. tenuis* em condições de campo. A mortalidade dos insetos capturados em iscas com estes tratamentos, em laboratório, sugere sua adequação para utilização no controle de *H. tenuis*, na estratégia de introdução inoculativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267. 1925.
- ADAMS, R.P.; McDANIEL, C.A.; CARTER, F.L. Termiticidal activities in the heartwood, bark/sapwood and leaves of *Juniperus* species from the United States. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.16, n.5, p.453-456, 1988.
- AGUDA, R.M.; ROMBACH, M.C.; SHEPARD, B.M. Effect of neem oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **International Rice Research Newsletter**, v.11, n.4, p.34-35, 1986.
- AHN, Y.J.; LEE, S.B.; LEE, H.S.; KIM, G.H. Insecticidal and acaricidal activity of cavarcol and beta-thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. **Journal of Chemical Ecology**, v.24, n.1, p.81-90, 1998.
- AKHTAR, M.S.; RAJA, Z.A. Survival and feeding responses of *Bifiditermes beelsoni* (Gardner) to wood and wood extracts of *Albizia procera* and *Bauhinia variegata*. **Pakistan Journal of Zoology**, v.17, n.4, p.363-367, 1985.
- ALMEIDA, J.E.M. Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba, 1994. 105p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- ALMEIDA, J.E.M. Controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae) com isca associada a inseticidas e/ou *Beauveria bassiana* em cana-de-açúcar. Piracicaba, 1998. 131p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. Seleção de armadilhas para a captura de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.3, p.619-624, dez. 1995.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. Mortalidade de *Heterotermes tenuis* (Hagen) atraídos por armadilhas com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e imidacloprid. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, n.3, p.507-512, dez. 1996.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). **Journal of Applied Entomology**, v.121, p.539-543, 1997.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; MOINO Jr., A.; LOPES, R.B. Controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) com iscas termitrap impregnadas com inseticidas e associadas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, n.4, p.639-644. 1998
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M. Novas alternativas para o controle microbiológico de cupins. BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R. (Ed.) **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba: FEALQ, 1995. p.95-102.

- ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M.; SALOMÃO, R.; STIMAC, J.L. Influência de diferentes tipos de alimentos na suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) aos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.19, n.2, p.383-391. 1990.
- ALVES, S.B.; MOINO Jr., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.8, p.217-238.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO Jr., A.; STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M. Uso de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) em pastagens. **Ecossistema**, v.20, p.50-57, Out. 1995.
- ANDREWS, E.A. Observations on termites in Jamaica. **Journal of Animal Behavior**, v.1, p.193-228, 1911.
- BAO, L.; YENDOL, W.G. Infection of the Eastern Subterranean Termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) with the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. **Entomophaga**, v.16, n.3, p.343-352, 1971.
- BERTI FILHO, E. Pequenos insetos, grandes estragos. **Granja**, v.51, n.59. p.30-32, 1995.

- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; FARIA, M.R. Insect defense mechanisms against microorganisms. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6. Foz do Iguaçu, 1996. **Anais:** conferências e palestras. Foz do Iguaçu: Embrapa, CNPSo, 1996. p.249-257.
- BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.455-459, 2001.
- BULTMAN, J.D.; CHEN, S.L.; SCHLOMAN JUNIOR, W.W. Anti-termite efficacy of the resin and rubber fractionator overheads from a guayule extraction process. **Industrial Crops and products**, v.8, n.2, p.133-143, 1998.
- CAMARGO-DIETRICH, C.C.R.; COSTA-LEONARDO, A.M. Comportamento intra-específico do cupim *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera, Rhinotermitidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, n.2, p.421-427, 2000.
- CLARK, R.A.; CASAGRANDE, R.A.; WALLACE, D.B. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado Potato Beetle. **Environmental Entomology**, v.11, p.67-70, 1982.
- CORNELIUS, M.A.; GRACE, J.K. Semiochemicals extracted from a dolichoderine ant affects the feeding and tunneling behavior of the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, n.3, p.705-708, 1994.

- CORNELIUS, M.A.; GRACE, J.K.; FORD, P.W.; DAVIDSON, B.S. Toxicity and repellency of semiochemicals extracted from a dolichoderine ant (Hymenoptera: Formicidae) to the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Environmental Entomology**, v.24, n.5, p.1263-1269, 1995.
- COSTA, S.D.; GAUGLER, R. Influence of *Solanum* host plants on Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology**, v.18, n.3, p.531-536, 1989.
- COSTA-LEONARDO, A.M. A guerra química dos cupins. **Ciência Hoje**, v.10, n.56, p.26-34, 1989.
- CULLENY, T.W.; GRACE, J.K. Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. **Bulletin of Entomological Research**, v.90, p.9-21, 2000.
- DELATE, K.M.; GRACE, J.K. Susceptibility of neem to attack by the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shir. (Isopt., Rhinotermitidae). **Journal of Applied Entomology**, v.119, p.93-95, 1995.
- DELATE, K.M.; GRACE, J.K.; TOME, C.H.M. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the Formosan Subterranean Termite (Isopt., Rhinotermitidae). **Journal of Applied Entomology**, v.119, p.429-433, 1995.
- DEVI, P.S.V.; PRASAD, Y.G. Compatibility of oils and antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, n.1, p.91-93, 1996.

- ESCOUBAS, P.; LAJIDE, L.; MIZUTANI, J. Termite antifeedant activity in *Aframomum melegueta*. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1097-1099, 1995.
- FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. Controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em condições de campo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.20, n.1, p.46-49, 1991.
- FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.21, n.3, p.319-328, 1992.
- GIRIDHAR, G.; SANTOSH; VASUDEVAN, P. Antitermites properties of *Calotropis* latex. **Pesticides**, v.22, n.1, p.31-33, 1988.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; ESCOUBAS, P.; REINA, M.; MIZUTANI, J. Antifeedant and insecticidal activity of endemic Canarian Lauraceae. **Applied Entomology and Zoology**, v.29, n.2, p.292-296, 1994.
- GRACE, J.K. Influence of tree extractives on foraging preferences of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Sociobiology**, v.30, n.1, p.35-49, 1997.
- GRACE, J.K.; YAMAMOTO, R.T.; EBESU, R.H. Laboratory evaluation of the novel soil insecticide silafluofen against *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isopt., Rhinotermitidae). **Journal of Applied Entomology**, v.113, p.466-471, 1992.

- GRACE, J.K.; YATES, J.R. Behavioural effects of a neem insecticide on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Tropical Pest Management**, v.38, n.2, p.176-180. 1992.
- GRACE, J.K.; WOOD, D.L.; FRANKIE, G.W. Behavior and survival of *Reticulitermes hesperus* Banks (Isoptera: Rhinotermitidae) on selected sawdusts and wood extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n.1, p.129-139, 1989.
- GRAINGE, M.; AHMED, S. **Handbook of plants with pest-control properties**. New York: John Wiley, 1988. 470p.
- GUSMÃO, L. G.; CASTIGLIONI, E.; ALVES, S. B. Diseminación de *Beauveria bassiana* entre operarios de *Heterotermes tenuis*. **Manejo Integrado de Plagas**, v.52, p.89-92, 1999.
- HALL, D.W. Potential for microbial control of subterranean termites. In: ROSEN, D.; BENETT, F.D.; CAPINERA, J.L. (Ed.). **Pest management in the subtropics: biological control**; a Florida perspective. Andover: Intercept, 1994. cap. 20, p.381-393.
- HALL, I.M.; DUNN, P.H. The effect of certain insecticides and fungicides on fungi pathogenic to the Spotted Alfalfa Aphid. **Journal of Economic Entomology**, v.52, p.28-29, 1959.

- HÄNEL, H.; WATSON, J.A.L. Preliminary field tests on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.73, p.305-313, 1983.
- HANIF, G.; CHAUDHRY, M.I.; FAROOQ, M.; RAHMATULLAH, J. Preliminary studies on antitermitic properties of common woods of Pakistan and their extractives. **Pakistan Journal of Forestry**, v.38, n.3, p.167-173, 1988.
- HARE, J.D.; ANDREADIS, T.G. Variation in the susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) when reared on different host plants to the fungal pathogen *Beauveria bassiana* in the field and laboratory. **Environmental Entomology**, v.12, n.6, p.1891-1896, 1983.
- HOWICK, C.D.; CREFFIELD, J.W. Intraespecific antagonism in *Coptotermes acinaciformis* (Froggat) (Isoptera:Rhinotermitidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.70, p.17-23, 1980.
- HUANG, Z.Y.; ZHANG, Y.G.; CHIU, S.F. Preliminary studies on the toxicity of the extract from *Ajuga nipponensis* against the termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Natural Enemies of Insects**, v.12, n.4, p.187-193, 1990.
- HUTCHINS, R.A. Evaluation of the natural antitermitic properties of *Aleurites fordii* (tung tree) extracts. **Journal of the Mississippi Academy of Sciences**, v.42, n.3, p.165-172, 1997.

- ISHIDA, M.; SERIT, M.; NAKATA, K.; JUNEJA, L.R.; KIM, M.; TAKAHASHI, S. Several antifeedants from neem oil, *Azadirachta indica* A. Juss., against *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera: Rhinotermitidae). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.11, p.1835-1838, 1992.
- JONES, S.C.; CARTER, F.L.; MAULDIN, J.K. *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae) responses to extracts from six Brazilian woods. **Environmental Entomology**, v.12, n.2, p.458-462, apr. 1983.
- KAWAGUCHI, H.; KIM, M.; ISHIDA, M.; AHN, Y.J.; YAMAMOTO, T.; YAMAOKA, R.; KOZUKA, M.; GOTO, K.; TAKAHASHI, S. Several antifeedants from *Phellodendron amurense* against *Reticulitermes speratus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.10, p.2635-2640, 1989.
- KHAN, H.K.; JAYARAJ, S.; GOPALAN, M. Testing of entomopathogenic fungi against agro-forestry termite, *Odontotermes wallonensis* (Wasmann). **Indian Journal of Forestry**, v.15, n.4, p.342-345, 1992.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F.; ROCKENBACH, P.G. Termite pathogens: transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.40, n.1, p. 1-6, 1982.
- LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Termite antifeedant activity in *Detarium microcarpum*. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1101-1104, 1995a.
- LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Termite antifeedant activity in *Xylopia aethiopica*. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p.1105-1112, 1995b.

- LEMAIRE, M.; NAGNAN, P.; CLEMENT, J.L.; LANGE, C.; ESCOUBAS, P. Le geranyl-linalool (diterpene alcool): une toxine naturelle du bois et des termites du genre *Reticulitermes*. **Actes des Colloques Insectes Sociaux**, v.3, p.103-107, 1986.
- LIN, T.S.; WANG, C.L. The anti-termite properties of extracts from *Melia azedarach* Linn. **Bulletin of the Taiwan Forestry Research Institute**, v.3, n.4, p.255-261, 1988.
- LOGAN, J.W.M.; ABOOD, F. Laboratory trials on the toxicity of hydramethylnon (Amdro; AC 217,300) to *Reticulitermes flavipes* Feytaud (Isoptera:Rhinotermitidae) and *Microtermes lepidus* Sjöstedt (Isoptera:Termitidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.80, p.19-26, 1990.
- LOGAN, J.W.M.; COWIE, R.H.; WOOD, TG. Termite (Isoptera) control in agriculture and forestry by non-chemical methods: a review. **Bulletin of Entomological Research**, v.80, n.3, p.309-330, 1990.
- MACEDO, N. Atualização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R. (Ed.) **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba, FEALQ, 1995. p.121-126.
- MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; CAMPOS, M.B.S. Cupins: a grande praga dos canaviais. 1. Cupins em cana-de-açúcar: quando e como controlar. **Álcool & açúcar**, v.15, n.78, p.32-36. 1995.

- MACEDO, N.; CAMPOS, M.B.S.; BOTELHO, P.S.M. Iscas no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae). CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: SEB, 1997. p.190
- MARTIUS, C. Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta, Isoptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.41, n.2/4, p.179-194, 1998.
- McCHESNEY, J.D. After discovery: the issue of supply strategies in the development of natural products. In: HEDIN, P.A. **Bioregulators for crop protection and pest control**. Washington: American Chemical Society, 1994. cap.12, p.144-151. (ACS Symposium Series, 557).
- McDANIEL, C.A.; KLOCKE, J.A.; BALANDRIN, M.F. Major antitermitic wood extractive components of Eastern Redcedar, *Juniperus virginiana*. **Material und Organismen**, v.24, n.4, p.301-313, 1989.
- MESSER, A.; McCORMICK, K.; SUNJAYA; HAGEDORN, H.H.; TUMBEL, F.; MEINWALD, J. Defensive role of tropical tree resins: antitermitic sesquiterpenes from southeast Asian Dipterocarpaceae. **Journal of Chemical Ecology**, v.16, n.12, p.3333-3352, 1990.
- MOINO JUNIOR., A. Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba, 1998. 133p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- MOINO JUNIOR., A.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica de Brasil**, v.27, n.4, p.611-619, 1998.
- MOKABEL, A.N.M.; GOWDA, G. Evaluation of some important plant products for anti termite properties. **Journal of Ecobiology**, v.12, n.1, p.3-8, 2000.
- NAGESH, M.; REDDY, P.P. Comparative efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) and *Veticillium lecanii* (A. Zimmerman) Viegas in combination with botanicals against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 infecting *Crossandra unhulaefolia* L. **Journal of Biological Control**, v.9, n.2, p.109-112, 1995.
- NAGNAN, P.; CLEMENT, J.L. Terpenes from the maritime pine *Pinus pinaster*: toxins for subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.18, n.1, p.13-16, 1990.
- NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, N.; TCHUJO, P.T.; MOINO JÚNIOR, A. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.263-268, june 2001.
- NEVES, P.J.; ALVES, S.B. Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidacloprid. **Scientia Agricola**, v.52, n.2, p.305-311, abr./jun. 1999.
- NOVARETTI, W.R.T. Controle de cupins em cana-de-açúcar através do emprego de inseticidas de solo. **Boletim Técnico Copersucar**, v.33, p.39-44, 1985.

- OCHIEL, G.S.; EVANS, H.C.; EILENBERG, J. *Cordycepioideus*, a pathogen of termites in Kenya. **Mycologist**, v.11, n.1, p.7-9, 1997;
- PARIHAR, D.R. Termite management in arid zone of Rajasthan, India. **Pest Management and Economic Zoology**, v.2, n.1, p.81-84, 1994.
- PEARCE, M.J. Seals, tombs, mummies, and tunnelling in the drywood termite *Cryptotermes* (Isoptera: Kalotermitidae). **Sociobiology**, v.13, p.217-226, 1987.
- PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.38, p. 1097-1118.
- PIZANO, M.A. Controle de cupins de cana-de-açúcar. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R. (Ed.) **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba, FEALQ, 1995. p.103-114.
- PIZANO, M.A.; FONTES, L.R.O. Ocorrência de *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) e *H. longiceps* (Snyder, 1924) (Isoptera, Rhinotermitidae) atacando cana-de-açúcar no Brasil. **Brasil Açucareiro**, v.104, n.3/4, p.29, 1986.
- PIZANO, M.A.; MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M. Racionalização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. **Álcool & açúcar**, v.10, n.53, p.26-27, 1990.
- PUNG, S.H.; RATH, A.C.; WRIGHT, P.J.; HEADLAM, N. Effect of pesticides on germination, growth and infectivity of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. In: COREY, S.A; DALL, D.J.; MILNE, W.M. **Pest control and sustainable agriculture**. Melbourne: CSIRO, 1993.p. 264-267.

- RAMAKRISHNAN, R.; SUITER, D.R.; NAKATSU, C.H.; HUMBER, R.A.; BENNETT, .W. Imidacloprid-enhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.5, p.1125-1132, 1999.
- RAMOSKA, W.A.; TODD, T. Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the Chinch Bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. **Environmental Entomology**, v.14, n.2, p.146-148, apr. 1985.
- RICHARDSON, D.P.; MESSER, A.C.; NEWTON, B.A.; LINDEMAN, N.I. Identification and preparation of antiinsectan dienols from *Dipterocarpus kerrii* tree resins. **Journal of Chemical Ecology**, v.17, n.3, p.663-685, 1991.
- RODRÍGUEZ, C.; VENDRAMIM, J.D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Agricultura**, v.72, n.3. p.305-318, dez.1997.
- RODRÍGUEZ, L. D.A.; LAGUNES T.A.; RIESTRA D.D.; RODRÍGUEZ M.C.; VELÁZQUEZ M.J.; BECERRIL R.E.; RODRÍGUEZ C.S.; PACHECO V.E. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y extractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). **Manejo Integrado de Plagas**, v.44, p.14-19, 1997.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v.29, n.4, p.799-808, 2000.

- SARODE, S.V.; PATIL, P.P.; BORKAR, S.L. Evaluation of neem seed kernel extract in combinations with *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus against cotton bollworms. **Journal of Entomological Research**, v.19, n.3, p.219-222, 1995.
- SCHEFFRAHN, R.H.; HSU, R.C.; SU, NY.; HUFFMAN, J.B.; MIDLAND, S.L.; SIMS, J.J. Allochemical resistance of bald cypress, *Taxodium distichum*, heartwood to the subterranean termite *Coptotermes formosanus*. **Journal of Chemical Ecology**, v.14, n.3, p.765-776, 1988.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.271-297, 1990.
- SCHMUTTERER, H. Side-effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. **Journal of Applied Entomology**, v.121, n.2, p.121-128, 1997.
- SERIT, M.; ISHIDA, M.; HAGIWARA, N.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, S. Meliaceae and Rutaceae limonoids as termite antifeedants evaluated using *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.18, n.4, p.593-603, 1992b.
- SERIT, M.; ISHIDA, M.; NAKATA, K.; KIM, M.; TAKAHASHI, S. Antifeeding potency of neem (*Azadirachta indica*) extractives and limonoids against termite (*Reticulitermes speratus*). **Journal of Pesticide Science**, v.17, n.4, p.267-273, 1992a.
- SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J.L.; WEBB, R.E. Effect of neem seed extract upon the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and its nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, v.87, n.2, p.356-360, apr. 1994.

- SHARMA, S.; VASUDEVAN, P.; MADAN, M. Insecticidal value of castor *Ricinus communis* against termites. **International Biodeterioration**, v.27, n.3, p.249-254, 1990.
- SIMMONDS, M.S.J.; EVANS, H.C.; BLANEY, W.M. Pesticides for the year 2000: mycochemicals and botanicals. In: AZIZ, A.; KADIR, S.A.; BARLOW, H.S. (Ed.) **Pest management and the environment in 2000**. Wallingford: CAB International, 1992. cap. 10, p.127-164.
- SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v.59, n.2. p.173-179, 2000.
- STANSLY, P.A.; SU, N.Y.; CONNER, J.M. Management of subterranean termites, *Reticulitermes* spp. in a citrus orchard with hexaflumuron bait. **Crop Protection**, v.20, p.199-206, 2001.
- STATHERS, T.E.; MOORE, D.; PRIOR, C. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviridae* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, p.111-115, 1993.
- STELLER, S.D.; LABOSKY, P. Antitermitic properties of cellulose pads treated with bark extractives. **Wood and Fiber Science**, v.16, n.1, p.106-114, 1984.
- STOLL, G. **Natural crop protection**. Langen: Joseph Margraf, 1986. 188p.
- SU, N.Y. Field evaluation of a hexaflumuron bait for population suppression of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, n.2, p.389-397, 1994.

SU, N.Y.; SCHEFFRAHN, R.H. Laboratory evaluation of two chitin synthesis inhibitors, hexaflumuron and diflubenzuron, as bait toxicants against Formosan Subterranean Termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.86, n.5, p.1453-1457, 1993.

SU, N.Y.; SCHEFFRAHN, R.H. Laboratory evaluation of two slow-acting toxicants against Formosan and Eastern Subterranean Termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.84, n.1, p.170-175, 1991.

SU, N.Y.; TAMASHIRO, M.; HAVERTY, M.I. Characterization of slow-acting insecticides for the remedial control of the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v.80, n.1, p.1-4, 1987.

SU, N.Y.; TAMASHIRO, M.; YATES, J.R.; HAVERTY, M.I. Effect of behavior on the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan Subterranean Termite. **Journal of Economic Entomology**, v.75, p.188-193, 1982.

SU, R.H.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, S. Antifeeding constituents of *Phellodendron chinense* fruit against *Reticulitermes speratus*. **Journal of Pesticide Science**, v.15, n.4, p.467-572, 1990.

TAWATA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-dehydrokawain derivatives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, n.10, p.1643-1645, 1996.

- TEDDERS, W.L. *In vitro* inhibition of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by six fungicides used in pecan culture. **Environmental Entomolgy**, v.10, p.346-349, 1981.
- THOMAZINI, A.P.B.W.; VENDRAMIM, J.D.; LOPES, M.T.R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traca-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.1. p.13-17, jan./mar.2000.
- TORRECILLAS, S.M.; VENDRAMIM, J.D. Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.27-31, 2001.
- TRISYONO, A.; WHALON, M. Toxicity of neem applied alone and in combination with *Bacillus thuringiensis* to Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.6, p.1281-1288, dec. 1999.
- UMEH, V.C.; IVBIJARO, M.F. Effects of termite damage to maize of seed extracts of *Azadirachta indica* and *Piper guineense* in farmers' fields. **Journal of Agricultural Science**, v.133, p.403-407, 1999.
- VEGA, F.E.; DOWD, P.F.; MCGUIRE, M.R.; JACKSON, M.A.; NELSEN, T.C. *In vitro* effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of invertebrate pathology**, v.70, p.209-213, 1997.
- VENDRAMIM, J.D.; SCAMPINI, P.J. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, v.72, n.2, p.159-170, 1997.

- VENDRAMIM, J.D.; THOMAZINI, A.P.B.W. Traça *Tuta absoluta* (Meyrick) em cultivares de tomateiro tratadas com extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.607-611, 2001.
- VYAS, R.V.; JANI, J.J.; YADA, D.N. Effect of some natural pesticides on entomogenous muscardine fungus. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.30, p.435-436, 1992.
- WARTHEN JUNIOR., J.D. ***Azadirachta indica***: a source of insect feeding inhibitors and growth regulators. Washington: USDA, Science and Education Administration, 1979. 22p. (Agricultural Reviews and Manuals).
- YAGA, S.; KINJO, K.; FERNANDEZ, E.C.; ZERRUDO, J.V.; CASTILLO, S.A. The termite resistance of Okinawan timbers x termiticidal substances from *Bruguiera gymnorhiza*. **Journal of the Japan Wood Research Society**, v.37, n.4, p.358-362, 1991.
- ZECK, W.M. Synergism between a new insecticide and entomophagous fungi in the control of subterranean termites. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 25., Heidelberg, 1992. **Abstracts**. Heidelberg: Society For Invertebrate Pathology, 1992. p.304.

APÊNDICES

Tabela 1. Experimento nº 1 de associação de extratos vegetais e *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Heterotermes tenuis*

SOBREVIVÊNCIA DIA 1						
EXTRATOS	0	ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	95,8	96,8	94,8	91,9	90,6	94,0 a
MAFO	92,7	99,0	94,7	89,3	86,6	92,4 a
ÓLEO NIM	94,5	93,8	97,9	94,9	90,0	94,2 a
NIMKOL	96,7	90,8	93,8	89,5	74,4	89,0 a
MÉDIAS	94,9 A	95,1 A	95,3 A	91,4 AB	85,4 B	92,4
SOBREVIVÊNCIA DIA 2						
EXTRATOS	0	ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	95,8	96,8	93,7	87,8	80,2	90,9 a
MAFO	92,7	97,9	93,5	83,9	65,9	86,8 a
ÓLEO NIM	93,4	91,7	97,9	93,9	77,7	90,9 a
NIMKOL	94,6	88,7	88,7	86,4	45,6	80,8 a
MÉDIAS	94,1 A	93,8 A	93,4 A	88,0 A	67,4 B	87,3
SOBREVIVÊNCIA DIA 3						
EXTRATOS	0	ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	94,8	96,8	91,6	81,8	6,3	74,2 a
MAFO	92,7	95,8	90,4	67,8	3,1	70,0 a
ÓLEO NIM	90,1	90,7	96,8	90,8	0,0	73,7 a
NIMKOL	93,5	86,6	86,5	61,9	0,0	65,7 a
MÉDIAS	92,8 A	92,5 A	91,3 A	75,6 B	2,3 C	70,9
SOBREVIVÊNCIA DIA 4						
EXTRATOS	0	ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	92,6	95,7	90,6	59,5	0,0	67,7 a
MAFO	92,7	94,8	86,2	53,0	1,0	65,5 a
ÓLEO NIM	90,1	89,7	80,9	72,3	0,0	66,6 a
NIMKOL	92,5	82,4	80,2	37,3	0,0	58,5 a
MÉDIAS	92,0 A	90,6 A	84,5 A	55,5 B	0,3 C	64,6
SOBREVIVÊNCIA DIA 5						
EXTRATOS	0	ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	92,6	92,5	66,6	50,3	0,0	60,4 a
MAFO	91,7	90,6	67,2	43,4	0,0	58,6 a
ÓLEO NIM	86,8	86,6	70,5	56,8	0,0	60,1 a
NIMKOL	90,3	75,3	39,5	30,8	0,0	47,2 a
MÉDIAS	90,3 A	86,2 A	60,9 B	45,3 B	0,0 C	56,6
SOBREVIVÊNCIA DIA 6						
EXTRATOS	0	ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	92,6	90,4	44,6	48,2	0,0	55,2 a
MAFO	91,7	82,3	53,2	40,2	0,0	53,5 a
ÓLEO NIM	85,6	78,2	49,4	52,7	0,0	53,2 a
NIMKOL	90,3	62,9	23,2	25,3	0,0	40,3 a
MÉDIAS	90,1 A	78,5 A	42,6 B	41,6 B	0,0 C	50,5

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 2. Experimento nº 2 de associação de extratos vegetais e *Beauveria bassiana* para *Heterotermes tenuis*

SOBREVIVÊNCIA DIA 1				
<i>Beauveria bassiana</i> 634				
EXTRATOS	0	1x10 ⁷	5x10 ⁸	MÉDIAS
0	94,7	97,3	93,4	95,1 a
NIMKOL 0,2%	96,1	95,9	93,3	95,1 a
ÓLEO NIM 5%	96,0	97,3	96,2	96,5 a
INF.SEM.NIM 5%	96,0	96,1	94,9	95,7 a
MÉDIAS	95,7 A	96,7 A	94,5 A	95,6
SOBREVIVÊNCIA DIA 2				
<i>Beauveria bassiana</i> 634				
EXTRATOS	0	1x10 ⁷	5x10 ⁸	MÉDIAS
0	88,1	94,7	90,8	91,2 a
NIMKOL 0,2%	94,8	93,2	90,7	92,9 a
ÓLEO NIM 5%	93,3	93,3	94,9	93,8 a
INF.SEM.NIM 5%	93,3	92,1	86,1	90,5 a
MÉDIAS	92,4 A	93,3 A	90,6 A	92,1
SOBREVIVÊNCIA DIA 3				
<i>Beauveria bassiana</i> 634				
EXTRATOS	0	1x10 ⁷	5x10 ⁸	MÉDIAS
0	85,6 a A	90,7 a A	48,9 b B	75,1
NIMKOL 0,2%	82,8 a A	90,5 a A	64,0 ab A	79,1
ÓLEO NIM 5%	90,7 a A	90,7 a A	84,6 a A	88,6
INF.SEM.NIM 5%	90,7 a A	85,4 a A	8,8 c B	61,6
MÉDIAS	87,4	89,3	51,6	76,1
SOBREVIVÊNCIA DIA 4				
<i>Beauveria bassiana</i> 634				
EXTRATOS	0	1x10 ⁷	5x10 ⁸	MÉDIAS
0	85,6 a A	52,0 b B	12,0 b C	49,9
NIMKOL 0,2%	81,5 a A	83,8 a A	10,7 b B	58,6
ÓLEO NIM 5%	89,3 a A	90,7 a A	39,7 a B	73,2
INF. SEM.NIM 5%	90,7 a A	79,0 a A	0,0 b B	56,6
MÉDIAS	86,8	76,4	15,6	59,6
SOBREVIVÊNCIA DIA 5				
<i>Beauveria bassiana</i> 634				
EXTRATOS	0	1x10 ⁷	5x10 ⁸	MÉDIAS
0	80,4 a A	34,7 c B	0,0 a C	38,4
NIMKOL 0,2%	74,8 a A	79,7 ab A	4,0 a B	52,8
ÓLEO NIM 5%	88,0 a A	82,7 a A	5,1 a B	58,6
INF.SEM. NIM 5%	89,3 a A	50,1 bc B	0,0 a C	46,5
MÉDIAS	83,2	61,8	2,3	49,1
SOBREVIVÊNCIA DIA 6				
<i>Beauveria bassiana</i> 634				
EXTRATOS	0	1x10 ⁷	5x10 ⁸	MÉDIAS
0	75,2 a A	20,0 a B	0,0 a B	31,7
NIMKOL 0,2%	66,8 a A	63,3 a A	0,0 a B	43,4
ÓLEO NIM 5%	84,0 a A	50,7 a B	0,0 a C	44,9
INF.SEM.NIM 5%	88,0 a A	4,0 a B	0,0 a B	30,7
MÉDIAS	78,5	34,5	0,0	37,7

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 3. Experimento nº 3 de associação de Nimkol-L e *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Heterotermes tenuis*

SOBREVIVÊNCIA DIA 2						
NIMKOL-L		ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸
0	95,0	99,1	95,1	93,6	75,1	91,6 a
0,2 %	98,0	98,0	94,2	94,3	73,5	91,6 a
0,4 %	93,3	98,1	92,0	95,4	89,3	93,6 a
MÉDIAS	95,4 A	98,4 A	93,8 A	94,4 A	79,3 B	92,3
SOBREVIVÊNCIA DIA 3						
NIMKOL-L		ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸
0	92,0	96,1	79,4	53,9	37,7	71,8 a
0,2 %	95,2	98,0	85,3	61,6	25,7	73,2 a
0,4 %	61,8	93,3	72,5	58,2	13,6	59,9 a
MÉDIAS	83,0 AB	95,8 A	79,1 AB	57,9 B	25,6 C	68,3
SOBREVIVÊNCIA DIA 4						
NIMKOL-L		ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸
0	92,0	94,1	66,5	36,3	14,1	60,6 a
0,2 %	93,3	94,9	75,7	34,3	4,0	60,5 a
0,4 %	38,3	78,9	61,6	31,0	1,9	42,4 b
MÉDIAS	74,5 A	89,3 A	68,0 A	33,9 B	6,7 C	54,5
SOBREVIVÊNCIA DIA 5						
NIMKOL-L		ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸
0	91,0 a A	88,3 a A	60,5 ab A	15,6 a B	1,9 a B	51,5
0,2 %	92,3 a A	79,3 a A	68,9 a A	13,9 a B	0,0 a B	50,9
0,4 %	28,8 b BC	64,5 a A	38,1 b AB	10,0 a BC	0,0 a C	28,3
MÉDIAS	70,7	77,4	55,8	13,2	0,6	43,5
SOBREVIVÊNCIA DIA 6						
NIMKOL-L		ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸
0	91,0 a A	81,6 a AB	43,2 a BC	5,7 a CD	0,0 a D	44,3
0,2 %	89,3 a A	60,9 ab AB	44,8 a BC	5,9 a CD	0,0 a D	40,2
0,4 %	26,9 b A	35,8 b A	15,1 a A	0,9 a A	0,0 a A	15,7
MÉDIAS	69,1	59,4	34,4	4,2	0,0	33,4
SOBREVIVÊNCIA DIA 7						
NIMKOL-L		ENTOMOPATÓGENOS				MÉDIAS
		0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸
0	91,0 a A	74,0 a A	22,6 a B	0,0 a B	0,0 a B	37,5
0,2 %	86,4 a A	49,9 ab AB	21,6 a BC	5,0 a C	0,0 a C	32,6
0,4 %	25,9 b A	19,2 b A	3,0 a A	0,0 a A	0,0 a A	9,6
MÉDIAS	67,8	47,7	15,7	1,7	0,0	26,6

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 4. Experimento nº 4 de associação de Nimkol-L e *Metarhizium anisopliae* para *Heterotermes tenuis*

SOBREVIVÊNCIA DIA 1					
NIMKOL-L		<i>Metarhizium anisopliae</i> 1037			MÉDIAS
		1x10 ⁶	1x10 ⁷	5x10 ⁸	
0	96,2	82,1	91,2	77,9	86,9 a
0,2%	94,5	89,7	83,3	81,0	87,1 a
0,3%	93,7	86,3	91,0	88,5	89,9 a
0,4%	85,7	89,7	84,6	88,5	87,1 a
MÉDIAS	92,5 A	87,0 AB	87,5 AB	84,0 B	87,7

SOBREVIVÊNCIA DIA 2					
NIMKOL-L		<i>Metarhizium anisopliae</i> 1037			MÉDIAS
		1x10 ⁶	1x10 ⁷	5x10 ⁸	
0	92,3	74,4	87,4	56,1	77,5 a
0,2%	94,5	88,5	78,0	41,9	75,7 a
0,3%	91,2	82,5	87,2	38,5	74,8 a
0,4%	81,8	88,5	71,8	57,7	74,9 a
MÉDIAS	90,0 A	83,4 A	81,1 A	48,5 B	75,8

SOBREVIVÊNCIA DIA 3					
NIMKOL-L		<i>Metarhizium anisopliae</i> 1037			MÉDIAS
		1x10 ⁶	1x10 ⁷	5x10 ⁸	
0	92,3	64,1	56,1	15,4	57,0 a
0,2%	94,5	76,9	42,2	0,0	53,4 a
0,3%	89,9	76,2	61,5	7,7	58,9 a
0,4%	80,6	80,8	48,7	0,0	52,5 a
MÉDIAS	89,3 A	74,5 A	52,1 B	5,8 C	55,4

SOBREVIVÊNCIA DIA 4					
NIMKOL-L		<i>Metarhizium anisopliae</i> 1037			MÉDIAS
		1x10 ⁶	1x10 ⁷	5x10 ⁸	
0	90,4	56,4	17,4	1,3	41,4 a
0,2%	93,2	61,5	19,2	0,0	43,5 a
0,3%	89,9	66,5	26,9	0,0	45,8 a
0,4%	76,7	70,5	19,2	0,0	41,6 a
MÉDIAS	87,5 A	63,7 B	20,7 C	0,3 D	43,1

SOBREVIVÊNCIA DIA 5					
NIMKOL-L		<i>Metarhizium anisopliae</i> 1037			MÉDIAS
		1x10 ⁶	1x10 ⁷	5x10 ⁸	
0	90,4 a A	23,1 b B	11,2 a BC	0,0 a C	31,2
0,2%	91,9 a A	28,2 b B	6,4 a C	0,0 a C	31,6
0,3%	88,7 a A	65,3 a B	6,4 a C	0,0 a C	40,1
0,4%	75,4 a A	52,6 a B	0,0 a C	0,0 a C	32,0
MÉDIAS	86,6	42,3	6,0	0,0	33,7

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 5. Experimento nº 5 de associação de extratos vegetais e *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Heterotermes tenuis*

MORTALIDADE DIA 1						
EXTRATOS	ENTOMOPATÓGENOS					MÉDIAS
	0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	6.7 b A	9.0 b A	13.3 b A	7.9 b A	13.0 b A	10.0
NIMKOL 0,2%	33.3 a B	37.4 a B	73.1 a A	78.3 a A	61.8 a A	56.8
ÓLEO NIM 2%	9.7 b A	17.0 ab A	9.6 b A	10.6 b A	10.8 b A	11.5
MAFO 5%	6.7 b A	7.9 b A	14.8 b A	17.1 b A	18.4 b A	13.0
MÉDIAS	14.1	17.8	27.7	28.5	26.0	22.8

MORTALIDADE DIA 2						
EXTRATOS	ENTOMOPATÓGENOS					MÉDIAS
	0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	6.7 b B	9.0 b B	17.3 b B	7.9 b B	80.2 a A	24.2
NIMKOL 0,2%	36.0 a B	40.1 a B	75.8 a B	85.1 a A	100.0 a A	67.4
ÓLEO NIM 2%	9.7 b A	17.0 ab A	11.0 b A	10.6 b A	31.4 b A	15.9
MAFO 5%	6.7 b A	9.3 b A	16.2 b A	17.1 b A	18.4 b A	13.5
MÉDIAS	14.8	18.9	30.1	30.2	57.5	30.3

MORTALIDADE DIA 3						
EXTRATOS	ENTOMOPATÓGENOS					MÉDIAS
	0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	8.0 b	10.4 b	28.0 b	13.1 b	100.0 a	31.9
NIMKOL 0,2%	36.0 a	49.9 a	91.9 a	95.9 a	100.0 a	74.7
ÓLEO NIM 2%	11.1 b	19.5 b	11.0 b	13.2 b	95.9 a	30.1
MAFO 5%	8.0 b	11.9 b	18.9 b	18.4 b	42.4 b	19.9
MÉDIAS	15.8 C	22.9 C	37,5 B	35,2 B	84,6 A	39.2

MORTALIDADE DIA 4						
EXTRATOS	ENTOMOPATÓGENOS					MÉDIAS
	0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	9.3 b C	10.4 b C	52.0 b B	20.8 b C	100.0 a A	38.5
NIMKOL 0,2%	36.0 a B	52.6 a B	100.0 a A	100.0 a A	100.0 a A	77.7
ÓLEO NIM 2%	11.1 b B	20.8 b B	24.8 c B	23.7 b B	100.0 a A	36.1
MAFO 5%	8.0 b B	11.9 b B	18.9 c B	23.7 b B	81.3 a A	28.8
MÉDIAS	16.1	23.9	48.9	42.1	95.3	45.3

MORTALIDADE DIA 5						
EXTRATOS	ENTOMOPATÓGENOS					MÉDIAS
	0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	12.0 b C	16.9 b C	82.7 a A	49.2 b B	100.0 a A	52.2
NIMKOL 0,2%	38.7 a B	59.6 a B	100.0 a A	100.0 a A	100.0 a A	79.7
ÓLEO NIM 2%	11.1 b C	23.5 b BC	42.2 b B	43.4 b B	100.0 a A	44.0
MAFO 5%	9.3 b C	11.9 b BC	22.9 b BC	33.0 b B	94.8 a A	34.4
MÉDIAS	17.8	28.0	62.0	56.4	98.7	52.6

MORTALIDADE DIA 6						
EXTRATOS	ENTOMOPATÓGENOS					MÉDIAS
	0	Bb 10 ⁷	Bb 10 ⁸	Ma 10 ⁷	Ma 10 ⁸	
0	12.0 ab C	23.4 b C	90.7 a AB	67.2 b B	100.0 a A	58.7
NIMKOL 0,2%	38.7 a B	67.9 a B	100.0 a A	100.0 a A	100.0 a A	81.3
ÓLEO NIM 2%	12.4 ab D	26.1 b CD	59.8 b B	48.7 bc BC	100.0 a A	49.4
MAFO 5%	9.3 b B	11.9 b B	32.3 b B	36.9 c B	98.7 a A	37.8
MÉDIAS	18.1	32.3	70.7	63.2	99.7	56.8

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Experimento nº 6 de associação de extratos vegetais e *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Heterotermes tenuis*

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 1

EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0	0.0	1.4	0.5 a
NIMKOL 0,4%	1.4	2.1	0.0	1.2 a
ÓLEO NIM 1%	0.0	1.8	1.5	1.1 a
MAFO 1%	0.0	1.5	0.0	0.5 a
TPFV 1%	0.0	3.7	1.4	1.7 a
TPFV 5%	3.3	1.5	3.9	2.9 a
MÉDIAS	0.8 A	1.8 A	1.4 A	1.3

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 2

EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0	0.0	1.4	0.5 a
NIMKOL 0,4%	1.4	2.1	0.0	1.2 a
ÓLEO NIM 1%	0.0	1.8	1.5	1.1 a
MAFO 1%	0.0	1.5	0.0	0.5 a
TPFV 1%	7.5	3.7	1.4	4.2 a
TPFV 5%	3.3	1.5	5.4	3.4 a
MÉDIAS	2.0 A	1.8 A	1.6 A	1.8

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 3

EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0	0.0	5.4	1.8 a
NIMKOL 0,4%	1.4	9.1	0.0	3.5 a
ÓLEO NIM 1%	1.4	8.0	3.0	4.1 a
MAFO 1%	0.0	4.9	0.0	1.6 a
TPFV 1%	12.5	11.5	1.4	8.5 a
TPFV 5%	3.3	12.1	5.4	6.9 a
MÉDIAS	3.1 B	7.6 A	2.5 B	4.4

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 4

EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0	16.7	7.3	8.0 a
NIMKOL 0,4%	1.4	34.0	1.5	12.3 a
ÓLEO NIM 1%	1.4	16.5	3.0	7.0 a
MAFO 1%	0.0	6.6	0.0	2.2 a
TPFV 1%	18.2	16.8	1.4	12.1 a
TPFV 5%	3.3	22.1	5.4	10.3 a
MÉDIAS	4.1 B	18.8 A	3.1 B	8.6

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 5

EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0	31.5	7.3	12.9 a
NIMKOL 0,4%	2.9	61.5	4.5	23.0 a
ÓLEO NIM 1%	3.2	21.6	4.5	9.8 a
MAFO 1%	0.0	16.4	4.6	7.0 a
TPFV 1%	19.8	29.7	7.5	19.0 a
TPFV 5%	3.3	29.0	5.4	12.6 a
MÉDIAS	4.9 B	31.6 A	5.6 B	14.0

Tabela 6. Experimento nº 6 de associação de extratos vegetais e *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Heterotermes tenuis*

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 6				
EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0 a B	35.1 b A	9.3 a AB	14.8
NIMKOL 0,4%	4.7 a B	83.0 a A	12.1 a B	33.3
ÓLEO NIM 1%	4.9 a A	23.3 b A	7.9 a A	12.0
MAFO 1%	0.0 a A	19.6 b A	6.0 a A	8.5
TPFV 1%	23.3 a A	36.3 b A	8.9 a A	22.8
TPFV 5%	3.3 a A	29.0 b A	8.1 a A	13.5
MÉDIAS	6.0	37.7	8.7	17.5

MORTALIDADE ADICIONAL DIA 7				
EXTRATOS	0	FUNGOS Ma 5x10 ⁷	Bb 5x10 ⁷	MÉDIAS
0	0.0 a B	44.1 b A	20.5 a B	21.5
NIMKOL 0,4%	4.7 a B	91.3 a A	15.0 a B	37.0
ÓLEO NIM 1%	6.6 a A	29.4 b A	7.9 a A	14.6
MAFO 1%	0.0 a A	21.3 b A	7.9 a A	9.7
TPFV 1%	23.3 a AB	45.6 b A	14.8 a B	27.9
TPFV 5%	3.3 a B	35.2 b A	13.3 a AB	17.3
MÉDIAS	6.3	44.5	13.2	21.3

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)