

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**INTERFERÊNCIA DA PRESSURIZAÇÃO DA CALDA DE
PULVERIZAÇÃO SOBRE MICRORGANISMOS
ENTOMOPATOGÊNICOS**

LUIZ CLÁUDIO GARCIA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP

Junho – 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**INTERFERÊNCIA DA PRESSURIZAÇÃO DA CALDA DE
PULVERIZAÇÃO SOBRE MICRORGANISMOS
ENTOMOPATOGÊNICOS**

LUIZ CLÁUDIO GARCIA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP

Junho - 2003

Dedico este trabalho às pessoas que contribuíram para concretização deste sonho, em especial: aos colegas da pós-graduação, Fernanda, Rosemary, Francisco, Roberto Jasper, Euclides e Valdete.

Ao meu pai Luiz Garcia, que me ensinou a importância da verdade e da humildade na vida de um homem. À minha mãe Lourdes Pintar Garcia, a pessoa que me despertou para a beleza do mundo do conhecimento. Aos meus queridos irmãos Ângela e Mário, sempre presentes em meus pensamentos.

À minha amada esposa Cleide. Ela consegue ser ao mesmo tempo minha base de sustentação, pela sua força, meu ponto de equilíbrio, pela sua sabedoria e minha fonte de alegria, por seus encantos. Sem ela teria conseguido, mas com certeza o caminho não teria sido tão facilmente percorrido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida e apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Engenharia e Automação - IAC, localizado em Jundiaí - SP, na pessoa do Pesquisador Científico Dr. Hamilton Humberto Ramos, por dispor de equipamentos e pessoal.

Aos pesquisadores Dr. Antônio Batista Filho e Dr. Luís Garrigós Leite do Centro Experimental do Instituto Biológico, localizado em Campinas - SP, por cederem recursos físicos e humanos.

Ao Pesquisador Científico Dr. Flávio Moscardi, EMBRAPA - Soja, localizado em Londrina - PR, pela disponibilização de sua estrutura para testes de parte da dissertação.

À Prof^a. Dra. Sílvia Renata Siciliano Wilcken, da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Campus de Botucatu - SP, sempre solícita na contribuição para o desenvolvimento de parte do ensaio.

À Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Campus Botucatu - SP; centro de excelência, onde cursei as disciplinas do mestrado e realizei parte do experimento.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano, pela confiança depositada no projeto e a liberdade com que deixou que o mesmo fosse concretizado.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	02
3 INTRODUÇÃO.....	04
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	06
4.1 Controle biológico de insetos com organismos entomopatogênicos.....	06
4.2 Fungos entomopatogênicos.....	07
4.2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin.....	08
4.3 Bactérias entomopatogênicas.....	08
4.3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	09
4.4 Vírus entomopatogênicos.....	11
4.4.1 Baculovírus.....	12
4.5 Nematóides entomopatogênicos.....	13
4.5.1 <i>Steinernema glaseri</i> (Steiner).....	14
4.6 Tecnologia de aplicação de organismos entomopatogênicos.....	15
4.6.1 Pulverização de suspensão fúngica.....	17
4.6.2 Pulverização de suspensão bacteriana.....	18
4.6.3 Pulverização de suspensão viral.....	19
4.6.4 Pulverização de suspensão com nematóides.....	20
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 Delineamento experimental.....	25
5.2 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com <i>Metarhizium anisopliae</i>	25
5.3 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
5.4 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com Nucleopoliedrovírus de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (AgMNPV).....	27
5.5 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com <i>Steinernema glaseri</i>	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31

SUMÁRIO

	Página
6.1 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
6.2 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
6.3 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com Nucleopoliedrovírus de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (AgMNPV).....	35
6.4 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com <i>Steinernema glaseri</i> ..	38
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
8 CONCLUSÕES.....	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1 RESUMO

A tecnologia de aplicação desenvolvida para produtos químicos têm sido utilizada para organismos entomopatogênicos sem o estudo prévio das necessidades de adaptações que visem a manutenção da viabilidade desses agentes de controle biológico. O experimento teve por objetivo avaliar a influência da pressurização e despressurização da calda de pulverização na viabilidade dos seguintes microrganismos entomopatogênicos: *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, AgMNPV e *Steinernema glaseri*. Foi utilizado o sistema hidráulico de um pulverizador, sem filtros, equipado com ponta de pulverização de jato cônico JA-2, com 15 minutos de agitação da calda antes da coleta. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos: pressurização da calda em zero; 175,8; 351,6; 527,4; 703,2; 1.054,9; 1.406,5 kPa (zero, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 lbf.pol⁻²). A avaliação da viabilidade de *M. anisopliae* se deu através da porcentagem de conídios germinados. Para *B. thuringiensis* foi considerado o número de colônias formadas. A eficácia do AgMNPV foi estimada indiretamente, pela mortalidade causada às lagartas de *Anticarsia gemmatalis* no início do terceiro instar, alimentadas com dieta artificial impregnada com a suspensão viral. No experimento com o *S. glaseri* foi calculada a porcentagem de indivíduos vivos, determinada através de microscopia óptica, em lâmina de peters. Conclui-se que se pode pulverizar os entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. thuringiensis*, AgMNPV e *S. glaseri*, até a pressão de 1.406,5 kPa, sem que haja perda na viabilidade desses organismos utilizados como agentes de controle biológico.

EVALUATION OF THE PRESSURIZATION AND DECOMPRESSION ON SPRAYING SUSPENSION WITH ENTOMOPATHOGENIC ORGANISMS. Botucatu, 2003. 54p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LUIZ CLÁUDIO GARCIA

Adviser: Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO

2 SUMMARY

Application technology developed to chemical products has been employed for entomopathogenic organisms without the previous studies on the necessities of adaptations aiming at viability maintenance of these biological control agents. The objective of the research was to evaluate the influence of pressurization and decompression of spraying suspension in the viability of the following entomopathogenic microorganisms: *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, AgMNPV and *Steinernema glaseri*. The sprayer hydraulic system was used without filters and equipped with JA-2 hollow-cone nozzle type with 15 minutes of spray agitation before it collects. The experimental design was completely randomized, with seven treatments: pressurization of spraying suspension at 0.0; 175.8; 351.6; 527.4; 703.2; 1,054.9 and 1,406.5 kPa. Evaluation of the viability of *M. anisopliae* was estimated by the percentage of conidia germinated. For *B. thuringiensis*, the number of colonies formed. Efficiency on AgMNPV was estimated indirectly, by means of mortality caused to velvet bean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) in early third instar; the specimens were fed with artificial diet impregnated with viral suspension. For the experiment with the *S. glaseri* it was calculated the percentage of live specimens; observation were performed through optic microscopy, on Peters slide-blade. It was concluded that the entomopathogens *M. anisopliae*, *B. thuringiensis*, AgMNPV and *S. glaseri* can be sprayed up to the pressure of 1,406.5 kPa without loss in the viability of those organisms as agents of biological control.

keywords: biological control, application technology, entomopathogens.

3 INTRODUÇÃO

A forma mais usual de controle de pragas utilizada pelos agricultores é a química, entretanto, outras formas, como a aplicação de produtos biológicos, têm sido desenvolvidas e empregadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Dentre os produtos biologicamente ativos, atualmente à disposição no mercado, os microrganismos para o controle biológico de pragas, ou bioinseticidas, tem sua utilização elevada ano a ano. Tal tendência se explica pela busca gradual por produtos fitossanitários que minimizem os danos à saúde do agricultor, do consumidor e ao ambiente (ALMEIDA, 2001).

Porém, existem ainda vários fatores que limitam a expansão do uso de bioinseticidas, entre os quais: a etiologia e epizootiologia de vários grupos, ainda não bem conhecidas; a eficiência limitada por alguns fatores ambientais (ex. umidade relativa e radiação solar) e a dificuldade de produção em escala comercial, tanto em meio semi-sólido quanto líquido, a custos competitivos com aqueles dos inseticidas químicos em formulações comerciais. Portanto, a necessidade premente de pesquisas está relacionada aos estudos sobre etiologia e epizootiologia; produção comercial em meio líquido; formulações adequadas para cada bioinseticida, considerando o(s) inseto(s) visado(s); obtenção de isolados eficientes em condições de umidade relativa baixa e desenvolvimento de métodos adequados de aplicação a campo (MOSCARDI, 2001).

Dentre os vários métodos de aplicação de bioinseticidas a campo, está

a via líquida. Nesta modalidade, com os equipamentos habitualmente utilizados, uma formulação é misturada a um líquido apropriado, via de regra a água, e a suspensão submetida à pressão num circuito hidráulico, resultando a aplicação em forma de gotas, ou seja, pulverizada.

As aplicações de microrganismos entomopatogênicos têm sido realizadas com os mesmos equipamentos desenvolvidos para pulverização de produtos fitossanitários químicos, sem nenhuma avaliação prévia dos possíveis danos que o referido método possa causar a viabilidade de tais organismos, atribuindo-se a baixa eficácia do processo às condições ambientais. Partindo do pressuposto que se está pulverizando organismos vivos, a pressurização da calda e o atrito desses organismos às partes internas do circuito hidráulico podem causar danos físicos às suas estruturas de propagação. Da mesma forma, a despressurização, em curto intervalo de tempo, antecedendo e imediatamente após a pulverização, pode estar reduzindo o número de estruturas viáveis para o controle de determinado inseto praga e, conseqüentemente, a eficácia do bioinseticida.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da pressurização e despressurização da calda de pulverização, de zero a 1.406,5 kPa, na viabilidade de microrganismos entomopatogênicos, mais especificamente *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) e *Steinernema glaseri*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Controle biológico de insetos com organismos entomopatogênicos

A explosão demográfica, a redução da mão-de-obra no campo e a escassez de alimentos passaram a ser preocupação constante dos governos. A partir da década de 20, grandes investimentos foram aplicados na pesquisa agrícola, visando fornecer alimentos em quantidade e de qualidade para a população. Na área agrícola, o sucesso do DDT foi um marco na aplicação de recursos na pesquisa do controle químico. Daí em diante, os recursos passaram a ser alocados para experimentos com agroquímicos, em detrimento dos estudos sobre interações biogenéticas (RODRIGUES, 1995).

Após 80 anos, o controle de pragas pelo uso exclusivo de produtos químicos têm sido bastante questionado. Métodos de controle menos agressivos ao ambiente e à saúde humana são exigidos, principalmente pela opinião pública, agências ambientalistas e ações de vários governos. Dentro dessa nova abordagem, o controle de pragas com organismos entomopatogênicos tem se destacado. O melhor exemplo pode ser atribuído ao uso do *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta desfolhadora *Anticarsia gemmatalis* na cultura da soja no Brasil. Mais de um milhão de hectares são pulverizados anualmente com resultados satisfatórios de controle e retorno, em relação ao emprego de inseticidas, estimado em 50 milhões de dólares.ano⁻¹ (MOSCARDI, 1997).

Estima-se que mais de um milhão de espécies de insetos são conhecidas, de um total de 2,5 milhões que habitam o planeta. Deste total, cerca de 10 % podem ser consideradas pragas agrícolas ou urbanas. Considerando-se que cada espécie de inseto pode ser atacada por, no mínimo, um patógeno, pressupõe-se o potencial de expansão de tal tecnologia (NARDO & CAPALBO, 1998).

4.2 Fungos entomopatogênicos

Os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos fitófagos, aquáticos, subterrâneos e de causar epizootias naturais. Têm grande versatilidade e podem infectar diferentes estádios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES, 1998).

O modo de ação dos fungos dá-se, em sua maioria, através da penetração na cutícula do hospedeiro, com auxílio de enzimas ou força mecânica. Fragmentos do micélio invadem o hemocele do inseto e se instalam nos tecidos gordurosos. No estágio final da infecção, há produção de propágulos que saem do corpo do inseto, e servem de inóculo para a infecção de novos hospedeiros. Portanto, o ciclo das relações fungo-hospedeiro é delimitado pelas seguintes fases: adesão, germinação, formação de apressórios, penetração, colonização e reprodução. A eficiência do processo depende das condições ambientais (temperatura, luz, umidade, radiação solar), nutricionais, suscetibilidade do hospedeiro e viabilidade dos propágulos do patógeno (ALVES, 1986; GILLESPIE, 1988).

A maioria dos projetos de pesquisa com controle microbiano de insetos são com fungos entomopatogênicos. Tal fato se deve às características de ação desses patógenos: atuam por contato e ingestão, estão presentes em grande quantidade na natureza e apresentam grande variabilidade genética, o que dificulta a seleção de insetos resistentes a esses organismos (ALMEIDA et al., 2001a).

Para o desencadeamento do processo de controle biológico se utilizam estruturas de propagação dos fungos. Dentre os vários propágulos, o conídio é o mais adequado, já que é resistente às condições adversas do ambiente e pode ser preservado por um período de até um ano (ALVES, 1986).

4.2.1 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

O *M. anisopliae* pertencente ao Reino Fungi e Filo Ascomycota, desenvolve conidióforos em colunas compactas, conídios globosos alongados ou em forma de bastão, com comprimento em torno de 7,0 μm e largura próxima de 2,0 μm . As colônias podem ser verde, verde-amarela, acinzentada ou branca-amarela, dependendo do hospedeiro ou meio (ALVES, 1998).

Considerado um dos principais fungos entomopatogênicos, ocorre naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens (ALMEIDA et al., 2001a). Seu modo de ação inicia-se com a germinação dos conídios aplicados na área, os quais em contato com o tegumento do inseto penetram num período de dois a três dias (Figura 1). O período de colonização decorre de dois a quatro dias, e a esporulação ocorre de dois a três dias, dependendo do hospedeiro e das condições de temperatura e umidade do ambiente (CHARNLEY, 2002).

No Brasil, os principais projetos de controle de pragas com *M. anisopliae* são com: cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*; Hemiptera, Cercopidae); cigarrinhas das pastagens (*Mahanarva* spp., *Deois* spp. e *Zulia* spp.; Hemiptera; Cercopidae); cupins das pastagens (*Cornitermes cumulans*; Termitidae) e gorgulho da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus*; Coleoptera, Curculionidae).

4.3 Bactérias entomopatogênicas

As doenças de insetos causadas por bactérias foram descobertas em criações de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e abelhas (*Apis mellifera*), no final do século XIX, com estudos de Pasteur. Atualmente, os bioinseticidas bacterianos são os mais vendidos no mundo, representando pelo menos 60% do mercado (ALMEIDA et al., 2001b).

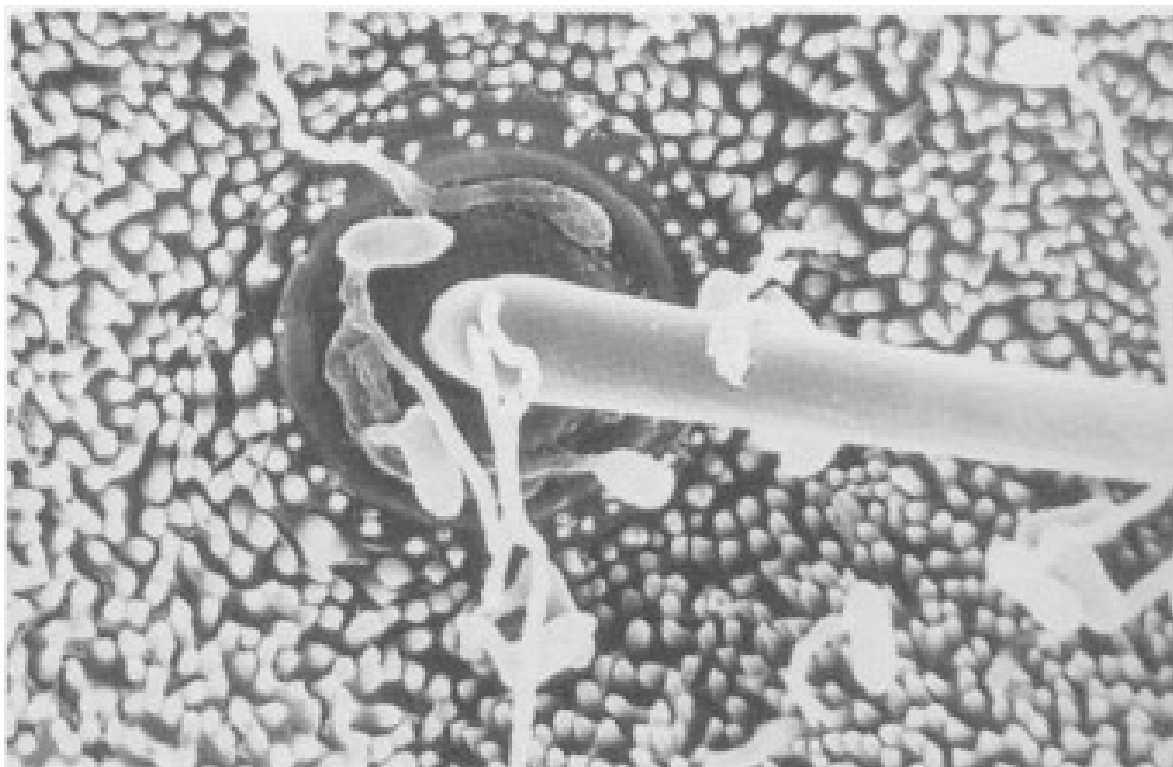


Figura 1. Germinação de esporos e formação de apressórios dos conídios de *Metarhizium anisopliae*, em microscopia eletrônica de varredura (1.000x), na inserção do pêlo, no corpo de uma lagarta de mandarová-do-fumo (*Manduca sexta*) (CHARNLEY, 2002).

4.3.1 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

O grupo de bactérias entomopatogênicas mais estudado pertence à família Bacillaceae. As espécies do gênero *Bacillus* caracterizam-se por apresentarem células vegetativas em forma de bastonetes, Gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, capazes de formar esporos. A espécie *B. thuringiensis* é conhecida como causadora de doenças de insetos desde 1901, quando foi isolada por Ishiwata no Japão. Sua ação inseticida tem se mostrado eficaz, especialmente pela especificidade a insetos-praga e compatibilidade com a conservação ambiental (FAUST & BULLA JÚNIOR., 1982; HARRIS, 1990 e ABBOTT, 1991).

Uma das características bacteriológicas típicas de *B. thuringiensis* é a formação de esporos elípticos e cilíndricos, em posição central, com um esporângio não nitidamente estendido. A célula bacteriana é um bastonete de 1,0 a 1,2 por 3,0 a 5,0 μm , geralmente com motilidade. É aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45⁰C. Em geral decompõe a tirosina, hidrolisa amido e caseína. É gram e catálise positiva, apresentando como característica típica a presença de um cristal proteico intracelular (HABIB & ANDRADE, 1998).

As variedades de *B. thuringiensis* produzem toxinas. Normalmente, os produtos à base de *B. thuringiensis* registrados têm como ingrediente ativo a toxina. No Brasil, a toxina mais empregada é denominada de δ -endotoxina, ou simplesmente toxina do cristal (HEIMPEL, 1967).

Após o crescimento vegetativo em meio artificial, *B. thuringiensis* transforma-se num esporo resistente às condições ambientais adversas. O cristal é formado durante esse processo de esporulação (SOMERVILLE & JAMES, 1970).

A formação do cristal proteico pode ser interpretada como uma adaptação coevolutiva que capacitou o *B. thuringiensis* a ocupar novos nichos ecológicos, ou seja, adaptar-se a novos insetos hospedeiros. De fato, as populações naturais dessa bactéria são muito diversas quanto à sua patogenicidade. Uma vez que a grande maioria dos genes para toxinas é extracromossômica, encontrando-se em plasmídios, novas combinações de toxinas podem sempre surgir naturalmente graças à transferência dessas partículas entre as diferentes linhagens (HABIB & ANDRADE, 1998).

Atualmente, sabe-se que o cristal protéico de *B. thuringiensis*, em si, não tem ação tóxica, sendo considerado pró-toxina. Estes cristais são estáveis em pH 3,0 a 5,0, mas a sua dissolução em meio alcalino (acima de pH 8,0), em tampões alcalinos redutores ou em solução de enzimas proteolíticas, resulta em moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos. Desse modo, as δ -endotoxinas seriam algumas dessas moléculas que participam na formação do cristal. Portanto, a dissolução desse cristal é sempre necessária para a liberação e atuação das δ -endotoxinas. Esse fato explica, a razão pela qual, apenas os insetos de pH intestinal alcalino são suscetíveis a esse patógeno e por que injeções intra-hemocélicas do cristal intacto não têm efeito tóxico (FAST & MARTINS, 1980).

A ação tóxica das δ -endotoxinas se dá por ingestão e está atrelada à dissolução do cristal em meio enzimático alcalino quando solubilizados e digeridos em insetos que possuem pH alcalino no trato digestivo. Os cristais se rompem, há liberação de porções menores que irão ligar-se à membrana do mesêntero desencadeando uma série de eventos que culmina com a morte do inseto (ADDISON, 1993 e ALMEIDA et al., 2001b).

Vários autores determinaram o peso molecular dos fragmentos tóxicos resultantes da hidrólise enzimática dos cristais de diferentes serótipos desse bacilo, com caracterização das suas proteínas e dos genes que as codificam. O peso molecular desses fragmentos ocorre na faixa de 40 a 140 kilodaltons (kD), mais freqüentemente de 60 a 70 kD (LECADET et al., 1972 e LILLEY et al., 1980).

Em vários países há registros de produtos formulados com *B. thuringiensis*; não só para o combate de pragas agrícolas e florestais, mas também para controlar culicídeos e simulídeos vetores de doenças humanas (HABIB & ANDRADE, 1998; VILARINHOS et al., 1998).

4.4 Vírus entomopatogênicos

Dentre os entomopatógenos, os vírus possuem um grande potencial para utilização no controle de insetos praga. Cerca de 600 insetos, incluindo lepidópteros, himenópteros, coleópteros e dípteros foram relatados como susceptíveis aos Baculoviridae. Entretanto, a maioria dos *Baculovirus* é bastante específica, afetando geralmente uma única espécie de insetos dentro de um gênero (GRONER, 1986). Por serem específicos ao nível de DNA, eficientes e seguros para o homem e outros animais, estes vírus preenchem todos os requisitos básicos como alternativa aos inseticidas tradicionalmente utilizados na proteção de culturas (GRONER, 1990 e BATISTA FILHO et al., 2001).

Os vírus contaminam os insetos por via oral. Normalmente, são ingeridos com os alimentos representados por folhas e caules de plantas. Após a ingestão, os poliedros que contêm as partículas de vírus (vírions), em condições alcalinas (pH > 7,5) do tubo digestivo (mesêntero), são dissolvidos liberando os vírions. Os vírions em contato com as microvilosidades intestinais liberam capsídeos nas células epiteliais do intestino, iniciando a

infecção primária. Posteriormente, atingem outros tecidos, com grande produção de cristais dentro das células caracterizando a infecção secundária, provocando o rompimento da parede celular. Nessa fase, os insetos contaminados liberam através do vômito e das fezes grandes quantidades de poliedros que representam importantes fontes de inóculo para outros insetos que vivem no mesmo habitat. O inseto em decomposição também representa uma fonte de inóculo muito significativa para a manutenção de epizootias (ALVES, 1986; NARDO et al., 1995 e BATISTA FILHO et al., 2001).

4.4.1 Baculovírus

Dentre os vírus de insetos, os baculovírus compreendem o maior e mais estudado grupo e é o que tem sido mais aplicado como bioinseticida. Possuem como principais características um vírion com envelope em forma de bastão e um DNA circular, dupla fita com 90 a 200 kilobases (kb) (ARIF, 1986). A família Baculoviridae é taxonomicamente subdividida em dois gêneros: o *Nucleopolyhedrovirus* e o *Granulovirus*. Os dois são constituídos de vírus envoltos por uma oclusão cristalina de natureza protéica (MURPHY et al., 1995). Os baculovírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus* são também denominados de vírus da poliedrose nuclear (NPV) e os *Granulovirus*, vírus de granulose (GV). Nos gêneros NPV e GV, o corpo de oclusão ou poliedro, que envolve o nucleocapsídeo, é de 0,5 a 15 µm de diâmetro e é composto principalmente de subunidades de uma proteína simples, de massa molecular em torno de 26 a 28 kD. Mais de 500 NPVs foram identificados em várias famílias de insetos e muitos parecem ser específicos para a família ou gênero de insetos em que os vírus foram isolados. Devido a essa especificidade, os NPVs são candidatos ideais para o uso em programas de controle integrado de pragas (MARUNIAK, 1986).

A principal rota natural de infecção por baculovírus é através da ingestão de alimento contaminado com o vírus na forma ocluída ou corpo de inclusão. No ambiente altamente alcalino do intestino médio da larva do inseto, os corpos de inclusão são rapidamente dissolvidos e as partículas virais são liberadas, dando início à infecção das células epiteliais do intestino médio. A infecção em lepidópteros geralmente se espalha rapidamente para outros tecidos a partir do sistema traqueal, causando a morte do inseto em poucos dias.

Quando a larva do inseto infectada pelo vírus morre, o seu tegumento se desintegra, liberando os corpos de inclusão no ambiente. As lagartas são mais suscetíveis à infecção viral durante os primeiros estádios de desenvolvimento. Típicos sintomas da infecção por NPVs incluem: perda de apetite, geotropismo negativo, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células da epiderme e tecido adiposo (RIBEIRO et al., 1998).

Os baculovírus infectam lepidópteros, himenópteros, dípteros, tricópteros, tisanuros e homópteros, podendo ocorrer em vários crustáceos e aracnídeos (FEDERICI, 1986).

4.5 Nematóides entomopatogênicos

Nematóides em geral são conhecidos pelos agricultores como prejudiciais às culturas, especialmente aqueles denominados comumente como nematóides das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*. Nematóides entomopatogênicos, entretanto, são inócuos às plantas, visto que não são providos de estilete (estrutura do corpo através da qual os parasitos de plantas se alimentam do conteúdo das células vegetais). São denominados entomopatogênicos porque vivem e atuam em associação com bactérias simbióticas, principalmente *Xenorhabdus nematophilus*, as quais são patogênicas aos insetos. Estas são encontradas na natureza somente em associação com nematóides entomopatogênicos ou em insetos por eles parasitados. Outros nematóides parasitos de insetos são também conhecidos como inimigos naturais e aliados do homem no controle de mosquitos, moscas, gafanhotos e outros (AGUILLERA, 2003).

Até o momento são conhecidos três gêneros de nematóides entomopatogênicos, a saber: *Steinernema*, *Heterorhabditis* e *Neosteinernema*. Destes, os dois primeiros têm sido intensivamente estudados em todo o mundo e, desde a época de sua descoberta, nas décadas de 20 e de 70, respectivamente, estão sendo multiplicados para aplicações em casa de vegetação e no campo. Estes nematóides caracterizam-se por vários aspectos favoráveis a seu uso na prática. Primeiro, por terem a capacidade de se locomover no solo à procura de hospedeiros para os quais são atraídos por diferencial no teor de CO₂ e possivelmente por componentes fecais. Segundo, por terem uma extensa lista de hospedeiros,

o que ajuda na sobrevivência em condições de campo (AGUILLERA, 2003).

Indicados principalmente para insetos que despendem pelo menos uma fase do ciclo biológico no solo, também podem ser usados para pragas de parte aérea, desde que medidas específicas sejam aplicadas. Testes de suscetibilidade feitos com alguns insetos benéficos mostraram que estes nematóides não são patogênicos a outros inimigos naturais. Podem ser multiplicados em laboratório, tanto "in vivo" (sobre um inseto hospedeiro) quanto "in vitro" (em diversos meios de cultura) e, além disto, podem ser armazenados antes de serem aplicados. Outro fator altamente favorável à viabilização do uso destes nematóides é o fato de não necessitarem de registro por parte de órgãos públicos para aplicação, como é exigido para os produtos químicos. Isto permite que nematóides nativos sejam multiplicados, testados quanto a infectividade a pragas de importância agrícola e em seguida aplicados a campo, num curto espaço de tempo após sua descoberta (BERG et al., 1987).

Alguns desses nematóides isolados no Brasil estão sendo objeto de estudos e têm-se mostrado infectivos em laboratório a pragas tais como: *Migdolus fryanus*, na cana-de-açúcar, bicho-furão (*Ecyitolopha aurantiana*) em citros, gorgulho da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*) e moleque da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) (AGUILLERA, 2003).

Tendo em vista que *Steinernema* e *Heterorhabditis* estão presentes em vários locais no Brasil, onde pragas suscetíveis continuam ocorrendo em níveis elevados, acredita-se que condições adequadas de manejo de solo possam favorecer o crescimento de populações de espécies e "strains" nativos, aumentando sua eficiência. Por outro lado, a perspectiva é de que em curto prazo estes nematóides nativos sejam multiplicados em laboratório para aplicações no campo na forma de inoculações inundativas – onde grandes quantidades do inóculo são aplicadas – ou do tipo inoculativo – onde apenas pequenos volumes de inóculo são aplicados. A escolha do método dependerá do comportamento do inseto alvo (FERRAZ, 1998; AGUILLERA, 2003).

4.5.1 *Steinernema glaseri* (Steiner)

O ciclo deste nematóide consiste nas fases de ovo, quatro estádios juvenis e um estádio adulto; com machos e fêmeas. Os juvenis infectivos constituem-se em

juvenis de terceiro estágio especializados, os quais são formados quando a fonte de alimento, ou seja, tecidos do inseto hospedeiro morto, e conseqüentemente células bacterianas, estão em vias de exaustão. Estes juvenis infectivos, com comprimento variando entre 800 e 1.500 μm , retêm a cutícula do segundo estágio, encapsulam células da bactéria simbiótica, principalmente *Xenorhabdus nematophilus*, numa bolsa localizada na parte anterior do intestino e têm o trato digestivo desativado. Nesta fase, portanto, não se alimentam e estão aptos a suportar condições ambientais inadequadas, enquanto localizam um novo hospedeiro. Quando isto ocorre, invadem o corpo do inseto através de aberturas naturais (bocas, ânus e espiráculos). Ao alcançar a cavidade do corpo, liberam na hemolinfa, através do ânus, células da bactéria simbiótica, as quais multiplicam-se rapidamente, e matam o inseto por septicemia em período de aproximadamente 24 a 48 horas, formando uma “sopa bacteriana”. Os nematóides, então, se desenvolvem alimentando-se da bactéria e alcançam o estágio adulto. Os adultos de primeira geração apresentam corpo bastante desenvolvido, com alta capacidade reprodutiva, multiplicam-se rapidamente e, desta forma, colonizam o inseto em curto espaço de tempo. As bactérias simbióticas produzem antibióticos impedindo que outros microrganismos se desenvolvam no inseto morto. Fêmeas produzem ovos que dão origem a juvenis e o ciclo se repete por cerca de três gerações até que haja indução para formação de juvenis infectivos, os quais abandonam o hospedeiro e migram no solo em busca de novo hospedeiro (FERRAZ, 1998; NGUYEN, 2002, AGUILLERA, 2003 e GAUGLER, 2003).

4.6 Tecnologia de aplicação de organismos entomopatogênicos

Para a utilização de organismos entomopatogênicos em maior escala, no controle de pragas de culturas anuais e perenes, de forma economicamente viável, dispõem-se dos equipamentos e tecnologia de aplicação desenvolvidos para agrotóxicos. Das tecnologias de aplicação de agrotóxicos a mais empregada no uso de entomopatógenos é a pulverização (ALVES, 1998). A pulverização pode ser considerada como um processo mecânico de geração de gotas; onde, partindo-se de um volume grande de líquido, produz-se um grande número de pequenas partículas desse líquido, chamadas de “gotas”. O processo se

dá pelo fornecimento de energia potencial a um determinado líquido, através da pressurização, forçando-o a passar por um circuito hidráulico e a sair por uma peça com orifício, chamada de “ponta de pulverização”. A geometria da ponta faz o líquido emergir em pequenos ligamentos que se quebram, posteriormente, em pequenas gotas. Dependendo do alvo que se quer ou pretende atingir com a pulverização necessita-se de um tamanho de gota adequado, independente do equipamento de aplicação. Os fatores que influenciam no tamanho da gota gerado na pulverização são: propriedades do líquido (viscosidade, densidade e tensão superficial), ponta (tipo, vazão e ângulo do jato) e pressão de trabalho (MATTHEUS, 1999).

A pressão é uma grandeza física que expressa a relação que uma determinada força exerce por área. Em seus estudos sobre o comportamento dos líquidos submetidos à pressão, Pascal concluiu que a pressão aplicada a um líquido encerrado num vaso se transmite, sem qualquer diminuição, a todo ponto do fluido e as paredes do vaso. Essa tese, que ficou conhecida como “Princípio de Pascal” permitiu a elaboração das leis da hidráulica e, conseqüentemente, do método de pulverização empregado na aplicação de agrotóxicos. A caracterização da pressão em uso corrente na comunidade internacional é o kilopascal (kPa) (TIPLER, 1991). A pressão provocada por um fluido contra um corpo tende a comprimir o corpo. Uma vez que todos os materiais diminuem de volume quando sujeitos a uma pressão externa, a diminuição relativa do volume é uma deformação compressiva. Quanto mais difícil de comprimir um material menor será a variação relativa para uma dada pressão e, portanto, menor será a compressibilidade. Da mesma forma, quanto mais fácil comprimir um material maior será a compressibilidade. Um corpo imerso em um líquido sobre pressão terá uma taxa de compressibilidade maior em sua parte gasosa do que na parte sólida e líquida (OKUNO et al., 1982).

Ao empregarmos a pulverização como técnica para aplicação de entomopatógenos, devemos nos atentar para o fato de que são organismos vivos, com porções corporais compostas de ar. Diferentemente dos líquidos, o ar é composto por moléculas dispersas que ao sofrer pressão se comprimem. Tal pressurização pode chegar a danificar estruturas do entomopatógeno e comprometer sua eficácia após a aplicação. Outra variável a se considerar é a despressurização. Ao sair do sistema hidráulico do pulverizador a calda pressurizada sofre despressurização abrupta. Na pressão atmosférica as moléculas comprimidas se dispersam novamente. A rápida dispersão dessas moléculas - acentuada na

porção aérea do microrganismo - pode sobrepor a capacidade de expansão das estruturas corporais dos entomopatógenos, podendo afetar significativamente as estruturas destes, como conídios, blastóporos, esporos, micélio, larvas de nematóides, bactérias não formadoras de esporos, cápsula viral, entre outros (ALVES et al., 1998). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de aplicação mais apropriada para formulações com organismos vivos. As informações, equipamentos e pesquisas sobre tecnologia de aplicação de organismos entomopatogênicos são escassos (ALVES et al., 1998; MOSCARDI, 2001).

O desenvolvimento de tecnologia de aplicação para organismos entomopatogênicos é uma atividade que deve envolver um grande número de pesquisadores e especialistas, promovendo uma ação interdisciplinar. Desta forma, pode-se minimizar o desperdício de energia, recursos e produtos, bem como possíveis danos causados pelo equipamento sobre os patógenos (MATUO, 1987; MATTHEWS, 1999; RAMOS, 2000). Nos experimentos sobre pulverização de entomopatógenos realizados por Ferron (1978), Bateman (1992), Mathews (1992), Douro-Kpindou et al. (1995), Jaronski et al. (1996), Wraight & Bradley (1996), Poprawski, et al (1997) e Milenia (2001), foram utilizadas pressões de 175,8 a 632,9 kPa (25 a 90 lbf.pol⁻²). Nenhum autor, porém, menciona qualquer estudo sobre o efeito desse fator na viabilidade dos entomopatógenos pulverizados.

4.6.1 Pulverização de suspensão fúngica

Sem dúvida, a tecnologia visando à aplicação de fungo pode ser considerada a mais específica e complexa. Provavelmente, em função disso, foi a que menos evoluiu até o momento, sendo poucas as pesquisas encontradas nessa área. Os fungos penetram normalmente via tegumento, onde os seus propágulos representados por esporos e conídios são geralmente aplicados em suspensão, aquosa, oleosa ou adicionados a outro veículo líquido. As formulações de micélio necessitam de máquinas especiais para a aplicação. No geral, estruturas de fungos não possuem grande resistência à radiação ultravioleta, às temperaturas e pressões elevadas. Dependendo da formulação, assim como do tamanho dos esporos, esses produtos fúngicos aplicados em suspensões aquosas necessitam de bicos e filtros especiais para se evitar os entupimentos (ALVES et al., 1998).

A literatura faz algumas referências sobre tipos de equipamentos, volume da calda, temperatura, altura do alvo, radiação ultravioleta e umidade relativa, sendo que comumente aponta parâmetros de tecnologia de aplicação estabelecidos para pulverização de agroquímicos.

Como alternativa aos equipamentos empregados na aplicação de fungos, somente as experiências de Naves et al. (1986), que desenvolveram o protótipo de um difusor para aplicação de formulações em pó ou granulados.

No caso de testes envolvendo pressurização e despressurização na pulverização de fungos entomopatogênicos, Nilsson & Gripwall (1999) submeteram vários produtos comerciais à base de blastóporos e conídios de *Verticillium lecanii* às seguintes pressões: 1×10^3 , 3×10^3 e 5×10^3 kPa (142, 427 e 711 lbf.pol⁻²). Os autores concluíram que a pressão de 1×10^3 kPa não influenciou significativamente na viabilidade relativa do fungo. Porém na pressão de 3×10^3 kPa a viabilidade caiu de 100 para em torno de 80 %, e com 5×10^3 kPa chegou-se somente a 45 % de viabilidade relativa de blastóporos e conídios de *V. lecanii*.

4.6.2 Pulverização de suspensão bacteriana

A bactéria mais utilizada no controle microbiano de inseto é *Bacillus thuringiensis* (Bt). As recomendações das indústrias produtoras deste patógeno são para uso de equipamentos convencionais, terrestres e aéreos, tomando-se cuidado de propiciar uma cobertura total das plantas. O volume de aplicação não deve ser menor que 50 L.ha⁻¹, onde qualquer sistema de pulverização que produza gotas de 100 a 400 µm pode ser utilizado. As pontas, segundo essas indústrias, podem ser de jato plano ou cônico e a aplicação realizada em área total ou com jato dirigido. Portanto, não existem aparelhos desenvolvidos especificamente para a aplicação desse entomopatógeno. Como as regulagens e adaptações necessárias dependem muito do nível técnico dos lavradores e de outros fatores, os resultados dessas recomendações são, na maioria das vezes, indesejáveis (ALVES et al., 1998).

Geralmente as bactérias suportam condições adversas no meio-ambiente, podendo sobreviver por muitos anos. As bactérias do gênero *Termofilicus* podem sobreviver em água fervente por 19 horas. O gênero *Bacillus* produz esporo em resposta a uma situação desfavorável, que resistem a situações de extremo calor, ausência de água, presença de radiações e substâncias químicas tóxicas (CARVALHAL & ALTERTHUM, 1999).

As bactérias também suportam altas pressões sem perder sua capacidade proliferativa. Tal resistência se deve principalmente a constituição da parede celular, que suporta pressão osmótica interna de 1.520 a 2.027 kPa, muitas vezes superior à do meio externo, de maneira que a tendência da célula a intumescer é grande e, se não fosse a presença da parede celular, estouraria (CARVALHAL & ALTERTHUM, 1999). Várias espécies vivem no oceano a 2.000 metros de profundidade sob pressões de até 39.381 kPa (JANNASCH et al., 1992; PELCZAR, 1997). Mais especificamente esporos do gênero *Bacillus*, em ensaios promovidos por Munakata & Rupert (1972), suportaram pressurização de até 600.000 kPa - por diversos períodos e temperaturas – sem ter sua capacidade proliferativa afetada.

4.6.3 Pulverização de suspensão viral

Vírus entomopatogênicos vêm sendo largamente empregados em vários países, visando o controle de pragas agropecuárias. No Brasil, a eficiência de vírus no controle de insetos-praga é uma realidade. Pode-se citar exemplos de produtos pulverizados em cultura de soja, milho e mandioca com nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), nucleopoliedrovírus de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) e *Erinnys ello* granulovirus (EeGV), respectivamente (MOSCARDI, 1998).

Existem vários fatores que estão relacionados à eficiência do vírus a campo, dentre os quais se destacam: qualidade do inóculo, quantidade de inóculo, substrato, radiação solar, temperatura, resistência ao vírus em populações de insetos, momento da aplicação e tecnologia de aplicação (MOSCARDI, 1998).

A utilização de vírus, assim como os demais entomopatógenos, tem sido prejudicada pela falta de equipamentos especiais de aplicação. Por serem patógenos que

só atuam via oral, a distribuição uniforme das formulações sobre a superfície vegetal é um fator determinante do sucesso desses agentes no controle de insetos-pragas. A cobertura vegetal depende de vários fatores, dentre eles há os relacionados aos equipamentos, como: tamanho da gota, volume de aplicação e pressão; os quais deveriam ser proporcionados por equipamentos desenvolvidos em função de cada um desses patógenos e de suas formulações. A tecnologia de aplicação tem se concentrado nas vias aérea e terrestre, utilizando-se na maioria das vezes, equipamentos convencionais (ALVES et al., 1998).

Em ensaios relacionados à tecnologia de aplicação de *Baculovirus anticarsia*, Silva & Moscardi (2002) chegaram às seguintes conclusões:

- a) As formulações controlam adequadamente a praga, em comparação à testemunha, no entanto, foram significativamente inferiores à preparação do vírus obtidas por maceração e filtragem de lagartas, demonstrando que essas formulações necessitam de aperfeiçoamento;
- b) A eficácia do nucleopoliedrovírus de *A. gemmatalis* Hübner (AgMNPV) foi significativamente afetada pelo pH da água, pois parcelas tratadas com suspensão com pH 6 apresentam número significativamente maior de lagartas infectadas pelo vírus que aquelas pulverizadas com suspensões com valores de pH 2 e 10;
- c) O volume de aplicação também influenciou no controle de *A. gemmatalis* pelo vírus. Volumes de 300, 200 e 100 L.ha⁻¹ foram igualmente eficientes, mas a 50 L.ha⁻¹ o controle do inseto foi significativamente inferior aos obtidos com os demais volumes, aparentemente pelo fato de ter ocorrido entupimento de bicos no menor volume;
- d) Quanto ao horário de aplicação, as maiores eficiências foram observadas para pulverizações realizadas às 2:00 h e 20:00 h, em comparação com as efetuadas às 8:00 h e 14:00 h;
- e) Não houve diferença na eficácia do vírus quando aspergido com diferentes pontas de pulverização;
- f) A adição de óleo mineral à calda não melhorou a performance do vírus formulado.

4.6.4 Pulverização de suspensão com nematóides

Como para os produtos químicos, as estratégias de aplicação de organismos entomopatogênicos são escolhidas pela máxima eficácia dos mesmos a campo. Esforços substanciais estão sendo dirigidos para o desenvolvimento de tecnologias que possam elevar a eficácia da aplicação de nematóides, isoladamente ou em conjunto com produtos químicos (ALVES et al., 1998).

Nematóides podem ser aplicados com equipamentos utilizados para agroquímicos, incluindo pulverizadores costais, pulverizadores de barra com ou sem assistência de ar, pulverizadores eletrostáticos e termonebulizadores (Tabela 1). Sua viabilidade não é afetada com a utilização de pressões de até 2.109,6 kPa em bicos comuns que produzam gotas maiores que 50 µm de diâmetro, desde que a temperatura não ultrapasse 32^oC; pois pode afetar a viabilidade dos nematóides (POINAR, 1986; AGUILLERA, 2003).

4.6.4.1 Momento de aplicação

Fatores abióticos e bióticos podem influir significativamente na eficácia da aplicação de nematóides. No que se refere aos fatores abióticos recomenda-se aplicação noturna devido à baixa radiação solar e temperaturas amenas (18 a 26^oC no solo). Dentre os fatores bióticos destaca-se o controle nos estádios de desenvolvimento do inseto-praga mais suscetíveis ao ataque do entomopatógeno (GEORGIS et al., 1983).

4.6.4.2 Irrigação e volume de aplicação

A umidade pré e pós-aplicação são essenciais para o movimento, persistência e infecção do nematóide (SIMONS & POINAR, 1983). A irrigação com o entomopatógeno *Heterorhabdi bacteriophorta* levou-o à mesma profundidade da penetração da água no solo, 0,64 m (SHETLAR et al., 1998).

O volume de aplicação varia conforme o solo, compactação, estrutura, cultura, inseto-alvo, comportamento do inseto-alvo e formulação. A literatura traz valores entre 935 a 2.800 L.ha⁻¹ (BERG et al., 1987 e KAYA, 1986).

Tabela 1. Equipamentos e/ou técnicas empregados na aplicação de nematóides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae em diferentes culturas.

Sistema	Insetos alvo	Cultura	Referência
Pulverizadores de barra ou manuais	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Milho	Kaya (1985)
	<i>Amyelois transitella</i>	Amêndoa	
Helicóptero e avião	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Amora	Lindgren et al. (1981)
	<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	Amora	
Irrigação por aspersão	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Amora	Georgis (1999)
	<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	Amora	
Irrigação com micro-aspersor	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Citros	Georgis (1999)
Irrigação com pivô central	<i>Diabrotica virgifera</i>	Milho	Georgis (1999)
Irrigação por gotejamento	<i>Acalymma vittatum</i>	Curcubitáceas	Reed et al. (1986)
	<i>Tridactylus capensis</i>	Gramados	Meredith et al. (1988)
	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Morango	Curran & Patel (1998)
Pulverização com bicos eletrostáticos	<i>Amyelois transitella</i>	Amêndoa	Kaya (1985)
	<i>Platyptilia carduidactyla</i>	Alcachofra	
Atomizadores	<i>Amyelois transitella</i>	Amêndoa	Georgis (1999)
Pulverização com bicos fotoelétricos intermitentes	<i>Platyptilia carduidactyla</i>	Alcachofra	Kaya (1985)
Injeção no solo	<i>Cristulariella</i> spp.	Pastagem	Kaya (1986) e Berg et al. (1987)
	<i>Diabrotica virgifera</i>	Milho	
	<i>Cyclocephala</i> spp.	Gramados	

4.6.4.3 Dosagem

Na literatura pesquisada não se estipula a dosagem ideal de nematóides entomopatogênicos por espécie, inseto-alvo ou cultura. No entanto há relatos do emprego de até 2,5 bilhões nematóides.ha⁻¹ (NGUYEN, 1988; AGUILLERA, 2003); porém, sem se especificar o método empregado para se chegar a tal valor.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O pulverizador empregado no experimento foi do tipo semi-estacionário, com motor elétrico trifásico de 4,0 CV; bomba de 3 pistões, modelo JP 42A, pressão máxima de 3.500 kPa, rotação de 800 rpm e vazão de 42 L.min⁻¹ e tanque com capacidade de 600 L. A ponta de pulverização escolhida foi a de jato cônico JA-2 (JACTO, 2002), por atender as especificações das pressões previamente estabelecidas. Todos os filtros do sistema hidráulico (do tanque, de linha e do bico) foram retirados, evitando que esta variável influenciasse nos resultados do experimento.

O volume de calda estabelecido para todos os entomopatógenos foi 200 L.ha⁻¹. O solvente utilizado foi a água, deionizada e esterilizada para evitar o desenvolvimento de contaminantes nos tratamentos do experimento. O pH do solvente variou de 6,1 a 6,8.

Antes da aplicação de cada organismo entomopatogênico, todo sistema hidráulico sofreu profilaxia pela passagem de água deionizada e esterilizada, por 15 minutos, e tríplice lavagem no tanque com o mesmo solvente. Assim, reduziram-se as chances de contaminação quando da coleta das suspensões contendo os respectivos entomopatógenos.

A pulverização da calda ocorreu em ambiente com temperatura sempre entre 10 e 25⁰C e umidade relativa do ar sempre acima de 50%, como indica a ISO (1996). Seguindo o método proposto por Nilsson & Gripwall (1999), antes da coleta da suspensão de cada tratamento, o sistema de agitação do pulverizador foi acionado durante 15 minutos, para homogeneização da calda.

5.1 Delineamento experimental

Os microrganismos selecionados para o experimento foram: *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, AgMNPV e *Steinernema glaseri*. A escolha se deu pela importância dos entomopatógenos em programas de controle biológico no Brasil.

O delineamento experimental utilizado, para os diferentes entomopatógenos, foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos: pressões de zero, 175,8; 351,6; 527,4; 703,2; 1.054,9 e 1.406,5 kPa (zero, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 lbf.pol⁻²). A escolha destas pressões teve como base a faixa de trabalho indicada para maior parte das pontas empregadas na pulverização de entomopatógenos.

As repetições foram de cinco, para *M. anisopliae* e *B. thuringiensis*, dez para AgMNPV e seis para *S. glaseri*. A diferença entre as repetições dos entomopatógenos se deu pelas particularidades de análise e tamanho da amostra. Porém, é importante ressaltar, que o total de 20 graus de liberdade - condição mínima para análise estatística (BANZATTO & KRONKA, 1995) - foram sempre superados.

Os dados (número de esporos germinados, colônias bacterianas, número de lagartas infectadas e concentração de partículas virais e número de nematóides viáveis) foram submetidos à verificação da homocedasticidade das variâncias, pelo teste de Hartley, à análise de variância (ANOVA) pelo teste “F” e à comparação de médias pelo teste Tukey, a 5,0 % de probabilidade.

5.2 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com *Metarhizium anisopliae*

O experimento foi realizado no Centro Experimental do Instituto Biológico, localizado em Campinas - SP. O pulverizador semi-estacionário foi cedido pelo Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Engenharia e Automação - IAC, localizado em Jundiaí - SP.

Para a análise da calda pulverizada com o fungo *M. anisopliae* foi utilizada a concentração de $2,5 \times 10^{10}$ conídios.L⁻¹, do isolado de IBCB-348, obtido de *Mahanarva fimbriolata*.

A suspensão pulverizada proveniente de cada tratamento foi coletada em recipiente estéril e posteriormente inoculada em placa de Petri, com alíquotas de 0,1mL, em meio contendo Batata Dextrose Ágar (200 g de batata, 20 g de Dextrose; 20 g de Ágar; 1 L de água destilada e 0,25 g de Pentabiótico) e espalhada com o auxílio da alça de Drigalsky. Tal procedimento teve como intuito estimular a conidiogênese do fungo.

Após o período de incubação (24,1^oC por 14 horas) foi realizada a quantificação em microscópio ótico (400x), contando-se os conídios por placa de Petri, a fim de se calcular a porcentagem de esporos germinados (ALVES & MORAES, 1998). Em função da dificuldade de se fotografar, com microscópio ótico, a germinação dos conídios em meio de cultura, foi utilizada, a fim de ilustração, a imagem obtida em microscopia eletrônica de varredura (Figura 2).

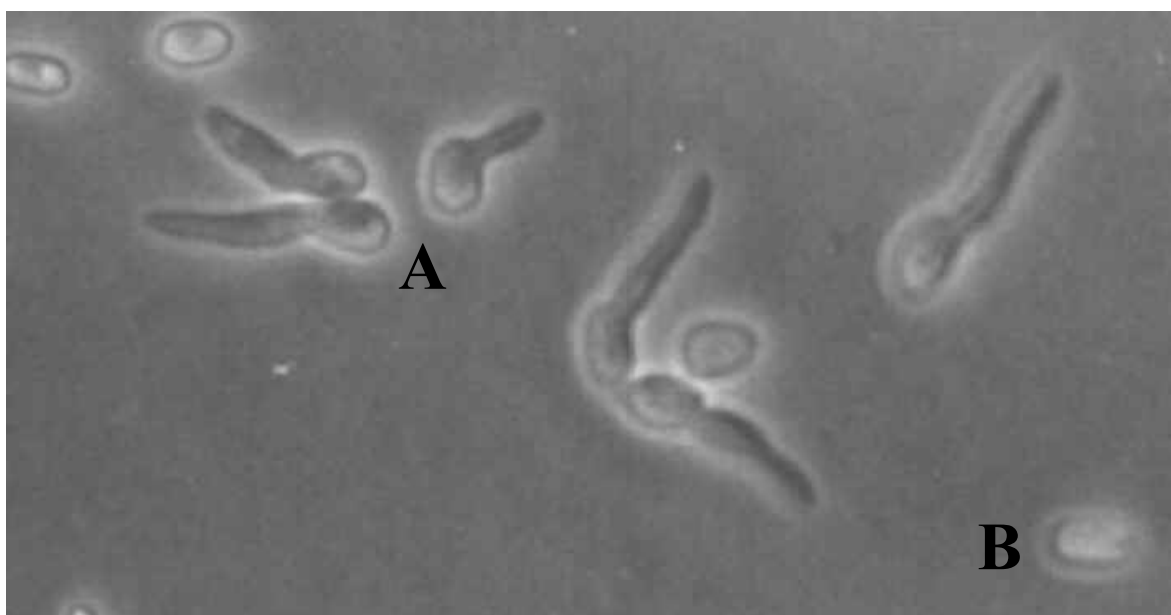


Figura 2. Conídios de *Metarhizium anisopliae* em microscopia eletrônica de varredura (1.000x), com (A) e sem (B) germinação de esporos (IHARA, 2003).

O tamanho da amostra (quantidade de conídios calculados por

repetição, aqui representada por placa de Petri) foi definido pelo método proposto por Kranz (1988) que leva em consideração a estabilização da média e/ou desvio padrão dos dados coletados e plotados em gráfico.

5.3 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com *Bacillus thuringiensis*

O experimento foi realizado no Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas - SP, utilizando-se o pulverizador semi-estacionário do IAC de Jundiá.

Para a bactéria *B. thuringiensis*, foi utilizada a concentração de 1,0 g.L⁻¹ do produto comercial DIPEL[®] PM. A suspensão pulverizada, proveniente de cada tratamento, foi coletada em becker de 500 mL, sendo posteriormente submetida a um período de 10 minutos a 80⁰C, em “banho-maria”, com o objetivo de se eliminar os contaminantes.

Foram realizadas sete diluições sucessivas, a partir de 1,0 mL da suspensão adicionando-se 9,0 mL de água destilada, para se determinar a diluição que possibilitasse a melhor quantificação das colônias. Posteriormente, o plaqueamento foi realizado em “meio L” (10 g de Peptona; 5 g de extrato de levedura; 5 g de cloreto de sódio; 15 g de Agar e 1,0 L de água destilada), sendo que o material foi transferido para ambiente controlado a 28,3°C por 17 horas. Ao final deste período foi escolhida a melhor diluição e fez-se a contagem do número de colônias, em cada repetição (placa de Petri), dos respectivos tratamentos (Figura 3).

5.4 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com Nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV)

O experimento foi realizado na EMBRAPA Soja, Londrina - PR. Por necessitar de organismos ou células vivas para a sua multiplicação optou-se pela realização de bioensaio, com lagartas de *Anticarsia gemmatalis* em terceiro ínstar, para verificação da influência da pressurização e despressurização da calda de pulverização contendo AgMNPV.

Foi pulverizado 0,1 g.L⁻¹ do produto comercial BACULOVIRUS AEE[®] PM. O produto utilizado continha, no mínimo, 7,5 x 10⁹ corpos poliédricos de inclusão (CPI).g⁻¹. Coletou-se a suspensão dos tratamentos e, após homogeneização do material e contagem dos CPI em câmara de Neubauer, preparou-se a diluição de lote ajustada para 4,9 x 10⁴ CPI.mL⁻¹.

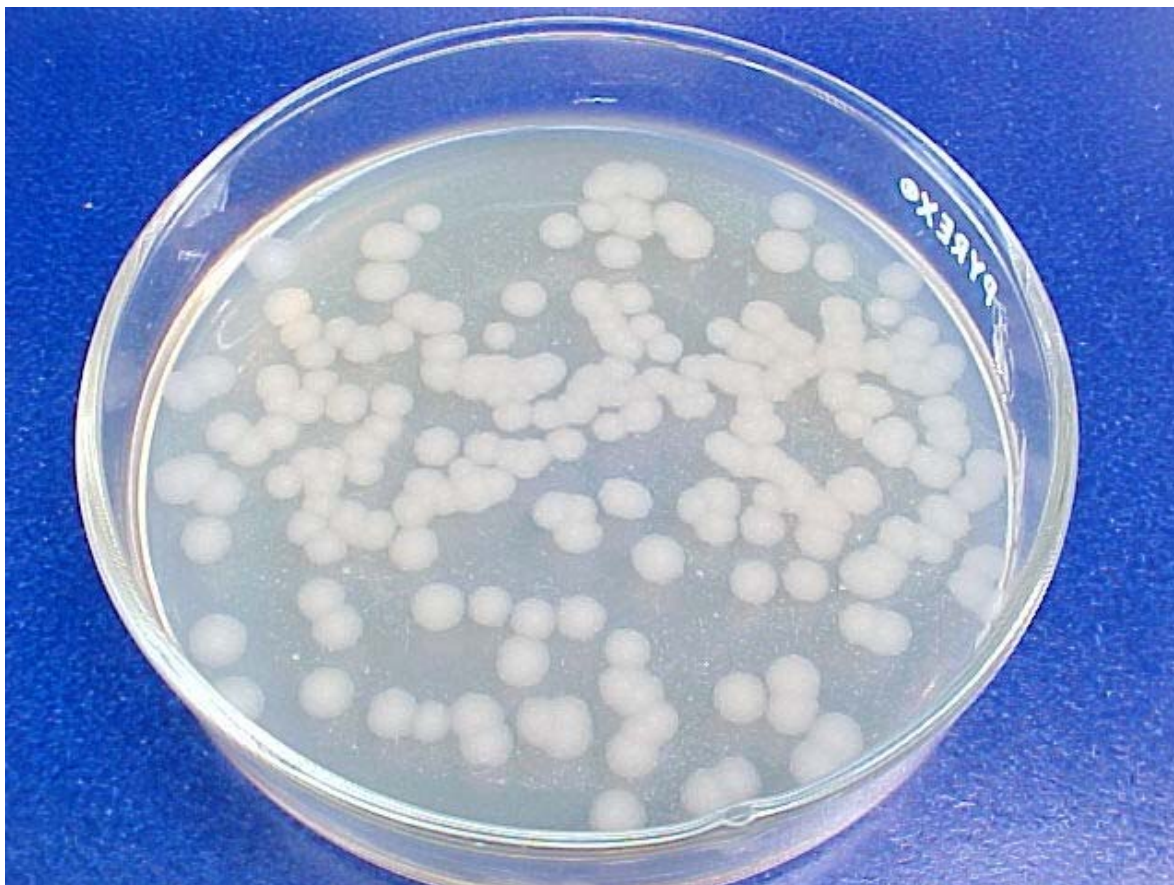


Figura 3. Colônias de *Bacillus thuringiensis* em placa de Petri com meio "L".

A dieta artificial para *A. gemmatalis* foi preparada utilizando-se os seguintes ingredientes: 62,5 g de feijão; 50,0 g de germe de trigo; 25,0 g de proteína de soja; 25 g de caseína; 31,2 g de levedura; 20,0 g de ágar; 3,0 g de ácido ascórbico; 1,5 g de ácido sórbico; 2,5 g de methyl 4-hydroxybenzoate (nipagin); 0,125 g de antibiótico; 7,5 g de vitamina; 1,0 L de água destilada e 3,0 mL de formol. Depois de preparada, a dieta foi

resfriada a 50⁰C e misturada, em becker, à suspensão com vírus; na proporção de 10 mL da suspensão para 90 mL de dieta. Assim, a concentração resultante foi 4,9 x 10³ CPI.mL⁻¹.

O controle da mortalidade das lagartas de *A. gemmatalis* por fatores não controlados foi realizado em dieta artificial não contaminada pelo AgMNPV (10 mL de água destilada misturada a 90 mL de dieta). A eficácia do produto utilizado no teste foi verificada pela inclusão do tratamento com dieta artificial contaminada pelo AgMNPV padrão da EMBRAPA Soja, que serve de controle de qualidade para os produtos formulados neste centro de Pesquisa.

Colocaram-se 10 mL de dieta em copos plásticos com capacidade de 50 mL, deixando-se à temperatura ambiente para resfriamento. O tamanho da amostra (número de lagartas de *A. gemmatalis*, no início do terceiro ínstar, por copos plásticos com dieta artificial) foi definido pelo método proposto por Kranz (1988) que leva em consideração a estabilização da média e ou desvio padrão dos dados coletados e plotados em gráfico.

As lagartas foram mantidas em câmara climatizada (BOD) a temperatura de 26 ± 2⁰C, umidade relativa de 70 ± 20 %, e fotofase de 14 horas. A avaliação foi realizada através do registro da mortalidade de lagartas e seu agente causal, ao 12⁰ dia de fornecimento de dieta artificial contaminada pelo AgMNPV; quando normalmente empupam (Figura 4). Os testes “F” e de Tukey foram aplicados com base nos dados coletados para a concentração de 4,9 x 10³ CPI.mL⁻¹ ao 12⁰ dia.



Figura 4. Lagarta de *Anticarsia gemmatalis*, sadia (A) e infectada (B) por AgMNPV.

5.5 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com *Steinernema glaseri*

O experimento foi realizado nos laboratórios de Tecnologia de Aplicação de Produtos Fitossanitários e de Nematologia, do Departamento de Produção Vegetal, Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, Câmpus de Botucatu - SP.

Para o estudo da influência da pressurização e despressurização da calda quando da pulverização do nematóide *S. glaseri*, foi necessário à multiplicação do entomopatógeno em larvas de traça-da-abelha (*Galleria mellonella*), pela inexistência de produtos comerciais, do referido nematóide, disponíveis no Brasil (WHITE, 1927).

A concentração empregada foi de 75.000 juvenis infectivos.L⁻¹. Após a passagem da calda pelo circuito hidráulico, sob as várias pressões, coletou-se 1,0 L da calda dos respectivos tratamentos e peneirou-se a suspensão em malha 500, convertendo a quantidade de juvenis infectivos.L⁻¹ para 20,0 mL.

As repetições de cada tratamento foram representadas pela contagem, em microscópio óptico com aumento de 40x, do número de juvenis infectivos por lâmina de Peters (com capacidade para 1,0 mL da suspensão concentrada), após 5,0 minutos da passagem pelo circuito hidráulico. A avaliação foi fundamentada na porcentagem de juvenis infectivos viáveis (Figura 5). O tamanho da amostra também foi definido pelo método proposto por Kranz (1988).



Figura 5. Juvenis Infectivos de *Steinernema glaseri* em microscópio óptico (40x), viável (A), ou não (B).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com *Metarhizium anisopliae*

Na definição do tamanho da amostra pelo método proposto por Kranz (1988), houve estabilização da média e desvio padrão da porcentagem de conídios germinados com 100 conídios contabilizados por repetição, para o isolado de *Mahanarva fimbriolata* CB-348 nas condições deste experimento (Figura 6). Porém, como havia um número extremamente maior de conídios por placa de Petri, optou-se por analisar 200 conídios por repetição. Buscou-se, assim, minimizar ainda mais o efeito das variáveis não controladas sobre o método empregado na coleta de dados do experimento.

O teste de Hartley apontou homocedasticidade das variâncias, não sendo necessário à transformação dos dados. O teste estatístico “F” não indicou diferenças significativas entre os tratamentos, com germinação média de conídios em 81,3%, dispensando o teste de Tukey. O conídio do *M. anisopliae*, por suas características de tamanho, mecanismo infectivo, colonização e esporulação (ALVES, 1998 e CHARNLEY, 2002), suportou tanto a pressurização como a despressurização da calda sem que houvesse diferença significativa na sua capacidade de germinação em meio de cultura, com um grau de confiança superior a 95% de probabilidade (Tabela 2).

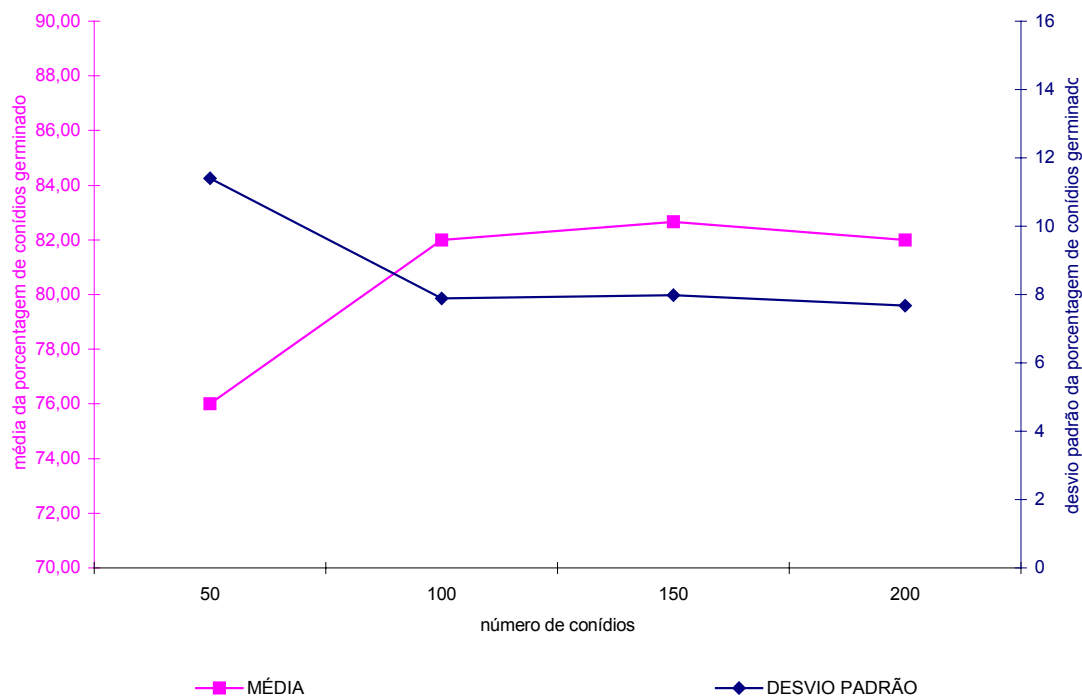


Figura 6. Média e desvio padrão da porcentagem de conídios germinados de *Metarhizium anisopliae*, isolado IBCB-348 obtido de *Mahanarva fimbriolata*, em placa de Petri com batata dextrose ágar (BDA).

Os resultados obtidos corroboram com os testes realizados com *V. lecanii* por Nilsson & Gripwall (1999), onde concluíram que somente a pressurização da calda acima de 3×10^3 kPa, e conseqüentemente despressurização neste nível, influem significativamente na viabilidade relativa de conídios de fungos.

No que se refere à faixa de pressão empregada na tecnologia de aplicação de agrotóxicos, pode-se utilizar os mesmos parâmetros para pulverização do entomopatógeno *M. anisopliae*. Isto viabiliza economicamente o emprego deste, por não haver custos de adaptação do parque de máquinas às particularidades do entomopatógeno.

Recomenda-se a escolha dos filtros (da linha e do bico) e, conseqüentemente, da ponta de pulverização adequados à formulação dos produtos cujo

ingrediente ativo seja o *M. anisopliae*. Malhas que retenham o produto no sistema hidráulico podem afetar significativamente a eficácia do entomopatógeno.

Tabela 2. Porcentagem de conídios germinados de *Metarhizium anisopliae*, isolado IBCB-348 obtido de *Mahanarva fimbriolata*, concentração de $2,5 \times 10^{10}$ conídios.L⁻¹, em placa de Petri com batata dextrose ágar (BDA), após serem submetidos a diferentes níveis de pressurização e despressurização em calda de pulverização.

Pressão (kPa)	Média (%)
zero	83,2 NS ⁽¹⁾
175,8	83,2 NS
351,6	80,2 NS
527,4	80,2 NS
703,2	80,8 NS
1.054,9	80,4 NS
1.406,5	81,2 NS
Desvio Padrão = 3,71	Erro Padrão da Média = 1,66
Média Geral = 81,31	Coefficiente de Variação = 4,57

(1) NS – não significativo pelo teste “F”, ao nível de 5% de probabilidade ($P > 0,05$).

6.2 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com *Bacillus thuringiensis*

A melhor diluição obtida no método empregado para a contagem do número de colônias por placa de Petri foi de 10^{-5} em relação à dosagem original de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ do produto comercial DIPEL[®] PM. Nesta diluição, pode-se contar, de forma clara, 18 colônias, em média, por placa de Petri.

O teste de Hartley apontou homocedasticidade das variâncias, não sendo necessário à transformação da média do número de colônias por placa de Petri. O teste estatístico “F” não indicou diferenças significativas entre tratamentos, dispensando o teste de

Tukey. Dessa forma, pode-se afirmar, com um grau de confiança superior a 95% de probabilidade, que os esporos de *B. thuringiensis* não foram influenciados pela pressurização e despressurização da calda quando pulverizados, até 1.406,5 kPa (Tabela 3).

Tabela 3. Número de colônias formadas a partir de esporos de *Bacillus thuringiensis*, na diluição de 10^{-5} da concentração de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ do produto comercial Dipel® PM, em meio “L”, após serem submetidos a diferentes níveis de pressurização e despressurização em calda de pulverização.

Pressão (kPa)	Média (unidades)
zero	17,4 NS ⁽¹⁾
175,8	19,0 NS
351,6	21,4 NS
527,4	17,0 NS
703,2	17,0 NS
1.054,9	17,0 NS
1.406,5	17,2 NS
Desvio Padrão = 4,79	Erro Padrão da Média = 2,14
Média Geral = 18,00	Coefficiente de Variação = 26,63

(1) NS – não significativo pelo teste “F”, ao nível de 5% de probabilidade ($P > 0,05$).

É interessante ressaltar que apesar do método empregado avaliar a capacidade de formação de colônia a partir do esporo, em meio de cultura, não se testou o efeito da pressurização e despressurização sobre a δ -endotoxina; que é a responsável pela morte do inseto-praga (ADDISON, 1993; ALMEIDA et al., 2001b). Contudo, se a pressurização e despressurização não afetaram o esporo da bactéria, provavelmente não afetará o cristal; que por ter suas partículas mais coesas sofre menor efeito da pressurização e despressurização, conforme afirmação de Okuno et al. (1982). Outro fator que deve ser levado em consideração é que o cristal forma-se na esporulação das colônias; portanto, se a pressurização e despressurização não comprometeram o crescimento de colônias também não afetaram a formação dos esporos.

As considerações de Carvalho & Alterthum (1999), Jannasch et al. (1992), Pelczar (1997) e Munakata & Rupert (1972), sobre a resistência da bactéria, e no caso específico do gênero *Bacillus*, seu esporo, à pressurização, foram ratificadas. Tal resistência se deve às características morfológicas, arranjo anatômico, tamanho e adaptação a ambientes diversos (FAUST & BULLA Jr., 1982; HARRIS, 1990; ABBOTT, 1991 e HABIB & ANDRADE, 1998).

No ensaio conduzido por Munakata & Rupert (1972), a pressão de 600.000 kPa superou e muito as normalmente utilizadas na pressurização da calda para pulverização de entomopatógenos. Contudo, mesmo em condições extremas a capacidade proliferativa dos esporos do gênero *Bacillus* não foi afetada.

Além da resistência das estruturas da bactéria e seu esporo à compressão das partículas corpóreas promovidas pela pressurização, constatou-se nesse experimento a capacidade de suporte dessas mesmas estruturas quando da expansão abrupta dos componentes do organismo, oriundos da despressurização da calda quando lançada pelo sistema hidráulico do pulverizador.

No que se refere à faixa de pressão empregada na tecnologia de aplicação de agrotóxicos, pode-se utilizar os mesmos parâmetros para pulverização do entomopatógeno *B. thuringiensis*, não necessitando de qualquer adaptação. O que viabiliza economicamente o emprego deste, por não haver custos de adaptação do parque de máquinas às particularidades do entomopatógeno.

6.3 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com Nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV)

A definição do tamanho da amostra seguiu novamente o método proposto por Kranz (1988), sendo que à estabilização da média e desvio padrão da porcentagem de lagartas de *A. gemmatalis* mortas pela ação do AgMNPV ocorreu com 02 lagartas por parcela (Figura 7). Contudo, como houve a possibilidade da inclusão de mais uma lagarta no recipiente de 50 mL, optou-se por parcelas de 03 lagartas. Com este procedimento

objetivou-se minimizar o efeito das variáveis não controladas sobre o método empregado na coleta desses dados do experimento.

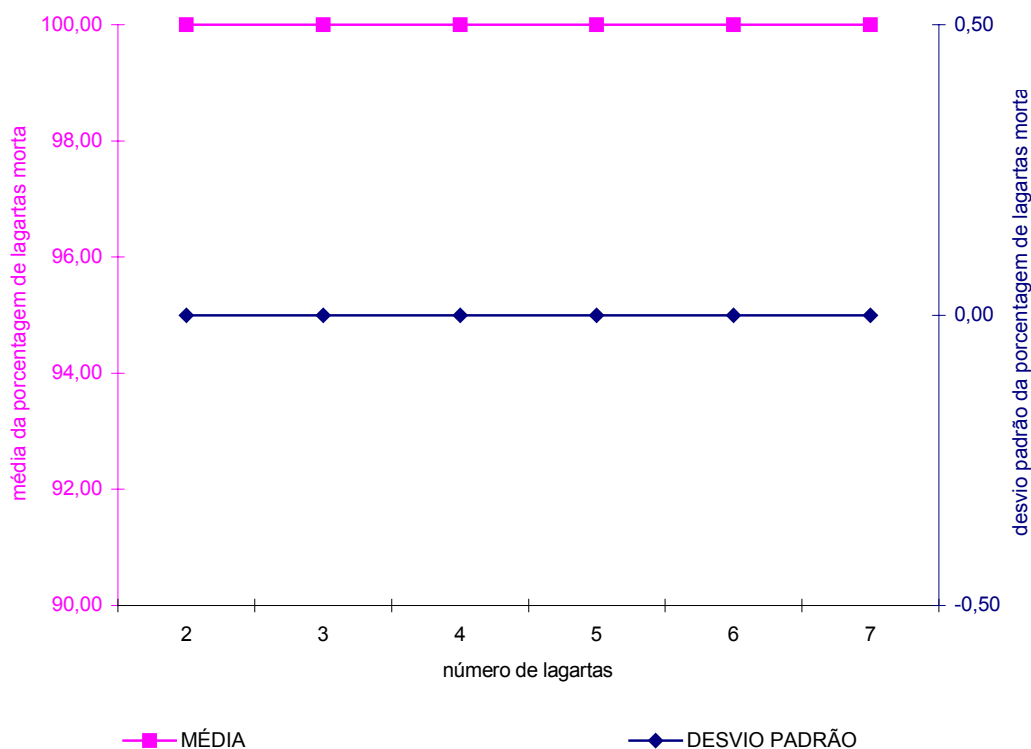


Figura 7. Média e desvio padrão da porcentagem de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, em terceiro ínstar, mortas pela ação de AgMNPV, ao décimo segundo dia em dieta artificial com $4,9 \times 10^3$ CPI.mL⁻¹.

O teste de Hartley apontou heterocedasticidade das variâncias, sendo necessário a transformação dos dados em $\arcsin \sqrt{x+1}$. O teste estatístico “F” indicou diferenças significativas entre os tratamentos, com um grau de confiança superior a 99% de probabilidade.

Dessa forma, empregou-se o teste de Tukey para verificação das diferenças entre as médias dos tratamentos. Verificou-se que os tratamentos envolvendo as pressurizações da calda em zero; 175,8; 351,6; 527,4; 703,2; 1.054,9; 1.406,5 kPa e AgMNPV padrão não diferiram significativamente entre si no que se refere à eficácia na mortalidade de

lagartas de *A. gemmatalis*, com média de 98,6%. Os referidos tratamentos só diferiram significativamente da testemunha, com 3,3% de mortalidade, que neste caso representou a alimentação das lagartas com dieta sem impregnação do AgMNPV (Tabela 4.).

Tabela 4. Porcentagem de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, em terceiro instar, mortas pela ação de AgMNPV - no décimo segundo dia em dieta artificial com $4,9 \times 10^3$ CPL.mL⁻¹ - após serem submetidos a diferentes níveis de pressurização e despressurização em calda de pulverização.

Pressão (kPa)	Média (%)
Testemunha	3,34 B ⁽¹⁾
zero	100,0 A
175,8	100,0 A
351,6	97,4 A
527,4	100,0 A
703,2	93,3 A
1.054,9	100,0 A
1.406,5	100,0 A
AgMNPV Padrão	100,0 A
DMS (Tukey) = 10,95	
Desvio Padrão = 6,41	Erro Padrão da Média = 2,86
Média Geral = 78,24	Coeficiente de variação = 8,19

(1) Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O AgMNPV, por suas características morfológicas, tamanho e massa (ARIF, 1986; MURPHY et al., 1995; MARUNIAK, 1986), suportou tanto a pressurização quanto a despressurização da calda sem que houvesse diferença significativa na sua capacidade infectiva de lagartas de terceiro ínstar de *A. gemmatalis*.

Os resultados obtidos corroboram com as afirmações de Alves et al. (1998) e com os testes realizados por Silva & Moscardi (2002) que dissertam sobre a semelhança das bases técnicas de tecnologia de aplicação de AgMNPV e de agrotóxicos.

No que se refere à faixa de pressão empregada na tecnologia de aplicação de agrotóxicos, pode-se utilizar os mesmos parâmetros para pulverização do entomopatógeno AgMNPV, não necessitando de qualquer adaptação. O que viabiliza economicamente o emprego deste, por não haver custos de adaptação do parque de máquinas às particularidades do entomopatógeno.

A escolha correta dos filtros (tanque, linha e bico) e, conseqüentemente, da ponta de pulverização adequados à formulação dos produtos a base de AgMNPV, é de fundamental importância para que o ingrediente ativo não fique retido nas malhas e afete significativamente a eficácia do processo. Silva & Moscardi (2002) concluíram que as formulações controlam adequadamente a praga, em comparação à testemunha; no entanto, foram significativamente inferiores à preparação do vírus obtidas por maceração e filtragem de lagartas, demonstrando que essas formulações necessitam de aperfeiçoamento. O problema pode ter sua causa não na formulação, e sim no tamanho da malha de filtros do tanque, linha e bico escolhidas para a pulverização de um produto pó molhável.

6.4 Pressurização e despressurização da calda de pulverização com *Steinernema glaseri*

A definição do tamanho da amostra também seguiu o método proposto por Kranz (1988). No caso do nematóide entomopatogênico *S. glaseri* a estabilização da média e desvio padrão se deu com 10 juvenis infectivos por lâmina de Peters, conforme os dados plotados na Figura 8. Todavia, devido à dificuldade de se precisar o número de nematóides por volume, a verificação da porcentagem de juvenis infectivos viáveis teve variação de 09 a 20 indivíduos por lâmina de Peters. Portanto, conseguiu-se trabalhar com o intervalo de nematóides nas amostras das parcelas compatível com o método proposto por Kranz (1988), dando confiabilidade estatística à análise dos dados.

O teste de Hartley apontou homocedasticidade das variâncias, não sendo necessário à transformação dos dados. O teste estatístico “F” não indicou diferenças significativas entre os tratamentos, dispensando o teste de Tukey. Os juvenis infectivos de nematóides *S. glaseri* mesmo sendo um dos maiores entomopatógenos (AGUILLERA, 2003;

BERG, et al. 1987; FERRAZ, 1998; GAUGLER, 2003 e NGUYEN, 2002), suportou tanto a pressurização como a despressurização da calda sem que houvesse diferença significativa na porcentagem de juvenis infectivos viáveis, com um grau de confiança superior a 95% de probabilidade (Tabela 5).

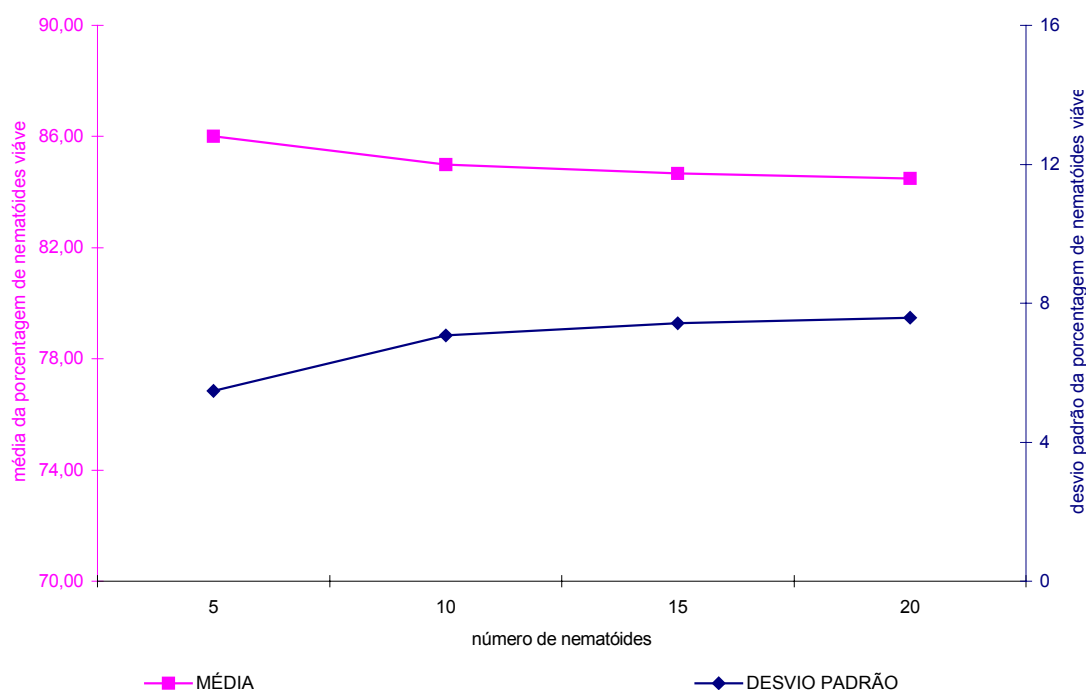


Figura 8. Média e desvio padrão da porcentagem de juvenis infectivos viáveis de *Steinernema glaseri*, em lâmina de Peters.

Os resultados obtidos corroboram com as afirmações de Poinar (1986) e Aguilera (2003), onde concluíram que somente a pressurização da calda acima de 2×10^3 kPa, e conseqüentemente despressurização neste nível, influem significativamente na viabilidade relativa de juvenis infectivos.

No que se refere à faixa de pressão empregada na tecnologia de aplicação de agrotóxicos, pode-se utilizar os mesmos parâmetros para pulverização do entomopatógeno *S. glaseri*, não necessitando de qualquer adaptação. O que viabiliza economicamente o emprego deste, por não haver custos de adaptação do parque de máquinas às particularidades do entomopatógeno.

Tabela 5. Porcentagem de juvenis infectivos viáveis de *Steinernema glaseri*, em lâmina de Peters, concentração de 75.000 juvenis infectivos.L⁻¹, após serem submetidos a diferentes níveis de pressurização e despressurização em calda de pulverização.

Pressão (kPa)	Média (%)
zero	87,3 NS ⁽¹⁾
175,8	82,0 NS
351,6	87,8 NS
527,4	86,7 NS
703,2	85,3 NS
1.054,9	84,2 NS
1.406,5	83,2 NS
Desvio Padrão = 6,07	Erro Padrão da Média = 2,48
Média Geral = 85,21	Coefficiente de Variação = 7,12

(1) NS – não significativo pelo teste “F”, ao nível de 5% de probabilidade ($P > 0,05$).

Importante ressaltar a retirada dos filtros do sistema hidráulico. Com certeza impediriam a passagem do nematóide *S. glaseri*, pois o comprimento médio da forma infectiva empregada no experimento foi de 1.130 μm . A maior malha compatível com as pontas comumente utilizadas na aplicação de agrotóxicos é de número 50, que representa 50 orifícios por polegada. Ora se uma polegada tem 0,0254 m, ou 25.400 μm , o valor da divisão por 50 é igual a 508 μm ; valor este já 45% inferior, desprezando-se o espaço ocupado pela malha metálica, ao tamanho médio do entomopatógeno.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pressões recomendadas nas pulverizações de entomopatógenos têm-se limitado ao intervalo de 175,8 a 632,9 kPa (FERRON, 1978; BATEMAN, 1992; MATHEWS, 1992; DOURO-KPINDOU et al., 1995; JARONSKI et al., 1996; WRAIGHT & BRADLEY, 1996; POPRAWSKI, et al., 1997 e MILENIA, 2001). O experimento abrangeu uma faixa de pressão com o dobro da comumente recomendada, para sanar quaisquer dúvidas do efeito dessa variável sobre a viabilidade dos entomopatógenos em teste.

A retirada dos filtros do sistema hidráulico do pulverizador se fez necessário para evitar que uma variável não controlada interviesse nos resultados do experimento. Cabe a orientação de especialistas em tecnologia de aplicação na escolha das pontas e seus respectivos filtros para aplicação de entomopatógenos, e no desenvolvimento de métodos que levem em consideração as especificidades de cada organismo pulverizado para o controle de insetos-praga.

Com este trabalho, as dúvidas levantadas por Matuo (1987), Alves et al. (1998), Matthews (1999), Ramos (2000) e Moscardi (2001), relacionadas à influência da pressurização e despressurização sobre a viabilidade de microrganismos entomopatogênicos, foram esclarecidas; para os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, AgMNPV e *Steinernema glaseri*.

8 CONCLUSÕES

Os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, AgMNPV e *Steinernema glaseri*, podem ser pulverizados com pressões de até 1.406,5 kPa, sem que haja perdas na viabilidade desses organismos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT. **Dipel, el insecticida biológico con 21 años de uso en América Latina**. Chicago: Abbott Laboratories, 1991. p.10-16p.

ADDISON, J.A. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review. **Canadian Journal of forest research**, Ottawa, n. 23, p.2.329-2.342, 1993.

AGUILLERA, M. M. **Nematóides benéficos controlam pragas na agricultura**. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/informativo/index.html>. Acesso em: 18 de janeiro de 2003.

ALMEIDA, S. G. **Crise socioambiental e conversão ecológica da agricultura brasileira**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2001. p.90-98.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G. Fungos entomopatogênicos. In: CURSO SOBRE CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS, 7, 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Biológico, 2001a. p.3-39.

ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, L. F. A.; CAPALBO, D. M. F. Bactérias entomopatogênicas. In: CURSO SOBRE CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS, 7, 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Biológico, 2001b. p.40-54.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. 407p.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.306-381.

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógeno de insetos. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.765-777.

ALVES, S. B. et al. Equipamentos para aplicação de inseticidas microbianos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.269-287.

ARIF, B. M. The structure of the viral genome. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, New York, v.128, n.131, p.21-29, 1986.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 3 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.10-125.

BATEMAN, R. P. Controlled droplet application of mycopesticides to locust. In: LOMER, C. J.; PRIOR, C. **Biological control of locust and grasshoppers**. Wallingford, p. 249-254, 1992.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LEITE, L. G. Vírus entomopatogênicos. In: CURSO SOBRE CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS, 7, 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Biológico, 2001. p.54-59.

BERG, G. N. et al. A commercial method of application of entomopathogenic nematodes to pasture for controlling subterranean insect pests, **Plant Protection**, Florida, n.2, v.4, 174 - 178p., 1987.

CARVALHAL, M. L.; ALTERTHUM F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.9-24.

CHARNLEY, K. **Fungal pathogens of insects: from mechanisms of pathogenicity to host defense**. Disponível em <www.bath.ac.uk/bio-sci/charn2.htm>. Acesso em: 12 dez. 2002.

CURRAN, J.; PATEL, V. Use of trickle irrigation system to distribute entomopathogenic nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae) for the control of weevil pests (Coleoptera: Curculionidae) of strawberries. **Journal Agriculture.**, Hobart, n.28, p.639-644, 1998.

DOURO-KPINDOU, O-K. et al. Control of *Zonocerus variegatus* by ultra-low volume application of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* conídias. **Biocontrol Science Technology**, London, v.5, p. 131-139, 1995.

FAST, P. G.; MARTINS W. G. *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal toxin: dissociation into toxic low molecular weight peptides. **Biochemist Biophysics**, New York, n.95, p. 1.314-1.320, 1980.

FAUST, R. M.; BULLA Jr., L. A. Bacteria and toxins as insecticides. In: KRSTAK, E. **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. p.75-208.

FEDERICI, B. A. Ultrastructure of baculoviruses. In: GRANADO, R. R.; FEDERICI B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. vol.1, p.61-68.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-569.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Revision Entomology**, Florida, n.23, v,2, p.409-442, 1978.

GAUGLER, R. **Nematodes**. Disponível em: <<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html>>. Acesso em: 03 fev. 2003.

GEORGIS, R., POINAR Jr, G. O.; WILSON, A. P. Practical control of the cabbage root maggot, *Hylemia brassicae*, (Diptera: Anthomyiidae) by entomogenous nematodes. **Medical Science.**, New York, v.12, n.11, p.322, 1983.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boston: CRC Press, 1999. p.173-191.

GILLESPIE, A. T. Use of fungito control pests of agricultural importance. In: BURGESS, M.N. **Fungi in biological control systemms**. Manchester: University Press. 1988. p.37-54.

GRONER, A. Specificity and safety of baculovirus. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. p.177-202.

GRONER, A. Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E.W. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.135-202.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.386-446.

HARRIS, P. Environmental impact of introduced biological control agents. In: MACKAUER, M.; EHLER, L. E. **Critical issues in biological control**. Andover: Intercept Limited, 1990. p.289-300.

HEIMPEL, A. M. A taxonomic key for crystalliferous bacteria relates to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal Invertebrate Pathological.**, New York, n.9., p.364-375, 1967.

IHARA, F. Germination conidia *Metarhizium anisopliae*. Disponível em: <www.fruit.affrc.go.jp/.../Deutte/Metarh/micro/101-104M.jpg>. Acesso em: 24 mar. 2003.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. **ISO 5682-1**: equipment for crop protection - spraying equipment. 2.ed. Geneva, 1996. p.1-9.

JACTO. **Produtos**. Disponível em: <<http://www.jacto.com.br/produtos>>. Acesso em: 24 jan. 2002.

JANNASCH, H. W. et al. Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deepsea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. Appl. **Environment Microbiological**, New York, v.2, n.347, p.348-358, 1992.

JARONSKI, S. T.; LORD, J. C.; PADEN, R. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Micotrol®WP) with pyrethroids for control of whitefly in spring cantaloupes. **Arthropod Manage**, Tets, v.1, n.2, 1996. p.21-103.

KAYA, H. K. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. In: HOY, M. A.; HERZOG, D. C. (ed). **Biological control in agricultural IPM systems**. New York: Academic Press, 1985. p.283.

KAYA, H. K. *Steinernema feltiae*: use against foliage feeding insects and effect on non-target insects. In: SAMDON, R. A., VLAK, J. M.; PETERS, D. (Ed.) Fundamental and Applied Aspects of invertebrate pathology. Proc. 4th. **International Congress Invertebrates Pathology**, Wageningen, p.268, 1986.

KRANZ, J. Measuring plant disease. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer, 1988. p.35-50.

LECADET, M. M.; CHEVRIER, G.; DEDONDER, R. Analysis of protein fraction in the spore coats *Bacillus thuringiensis*. **Journal Biochemist**, Dordrecht, n.25, p.349-358, 1972.

LILLEY, M.; RUFFEL, R. N.; SOMERVILLE, H. J. Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Genetic Microbiology**, Quebec, n.118, p.1-11, 1980.

LINDEGREN, J. E. et al. Compatibility of NOW parasite with commercial sprayers. **Agriculture**, Califórnia, vol.3 e 4, n.35, p.16-24, 1981.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R.; FREDERICI, B. A. (Eds.). **The Biology of Baculoviruses**, Boca Raton: CRC Press, 1986. vol. 1. p.129-146.

MATUO, T. Enfoque multidisciplinar da tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1. 1987, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Faculdade de ciências Agrônômicas e Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, 1987. p.3-11.

MATTHEWS, G.A. The principles of ultra-low volume spraying in relation to the application of microbial insecticides for locust control. In: LOMER, C.J.; PRIOR, C. **Biological control of locuts and grasshoppers**. Wallingford: CAB International, 1992. p.245-248.

MATTHEWS, G. A. **Application of pesticides to crops**. London: Imperial College Press, 1999. p.1-183.

MEREDITH, J. A.; SMART, G. C.; OVERMAN, A. S. Evaluation of drip irrigation systems for the delivery of *Neoplectana carpocapsae*, IFAS. **University Florida Annual Report**, Florida, Mole Cricket Research, v1, n3, p.20-38, 1988.

MILENIA. **Protege**. Disponível em:

<<http://www.milenia.com.br/internas/mm/produto.asp?p=42>>. Acesso em: 11 de outubro de 2001.

MOSCARDI, F. Desenvolvimento de bioinseticidas a base de vírus. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador. **Resumos...** Salvador: Sociedade Entomológica do Brasil, Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura - Embrapa, 1997. p.13.

MOSCARDI, F. **Situação atual e perspectivas de uso de entomopatógenos (vírus, fungos e bactérias)**. Disponível em: <<http://www.ferobio.ufv.br/relatorio/situaent.htm>> Acesso em: 12 out. 2001.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênico em campo. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.509-540.

MUNAKATA, N.; RUPERT, C. S. Genetically controlled removal of "spore photoproduct" from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores. **Journal Bacteriol**, New York, v.3, n.111, p. 192-198, 1972.

MURPHY, F. A. et al. (Eds.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Virology**, New York, v.2, n. 10, p. 1-586, 1995. Suplemento.

NARDO, E. A. B. et al. **Requisitos para a análise de risco de produto contendo AMC's de organismos nocivos**: uma proposta para os órgãos federais registrantes. Jaguariúna: Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente -EMBRAPA, 1995. p.42.

NARDO, E. A. B.; CAPALBO, D. M. F. **Análise de risco do uso de agentes microbianos de controle**: testes ecotoxicológicos sobre organismos não visados. Campinas: Instituto Biológico, 1998. p.57-78.

NAVES, M. A.; VALADARES, M. C. C.; LAMBERT, F. Z. I. Difusor para aplicação terrestre de formulações de microorganismos (pós e granulados) para controle biológico de

pragas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1986. p.45.

NGUYEN, K. B. **A new nematode parasite of mole crickets: its taxonomy, biology and potential for biological control**, Ph.D. Thesis (Biological Control) University of Florida, Gainesville, 1988. 148p.

NGUYEN, K. B. **Nematodes**. Disponível em: <<http://gnv.ifas.ufl.edu/~kbn/stein1.htm>>
Acesso em: 12 out. de 2002.

NILSSON, U.; GRIPWALL, E. Influence of application technique on the viability of the biological control agents *Verticillium lecanii* and *Steinernema feltiae*. **Crop Protection**, Willoughby, v.18, n.3, p. 53-59, 1999.

OKUNO, E.; CALDAS, I.; CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1982. p.292-315.

PELCZAR, M., J. **Microbiology: concepts and applications**. 6ed. New York: McGraw-Hill, 1997. p.64-65.

POINAR Jr, G. O. Entomophagous nematodes. In: FRANS, J. M. (Ed). **Biological plant and health protection**. Stuttgart: Frischler Verlag, 1986. p.95.

POPRAWSKI, T.J. et al. Early-season application of the fungus *Beauveria bassiana* and introduction of the hemipteran predator *Perillus bioculatus* for control of Colorado potato beetle. **Biological Control**, Flórida, v.10, n.1, p.48-57, 1997.

RAMOS, H.H. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos. **Fitopatologia brasileira**, Fortaleza, v. 25, n.3, 217-474, p.275-289, 2000. Suplemento.

REED, D. K.; REED, G. L.; CREIGHTON, C. S. Introduction of entomogenous nematodes into trickle irrigation systems to control striped cucumber beetle, *Acalymma vittatum* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal Economic Entomological**, Kansas, v.1, n.79, p.118-130, 1986.

RIBEIRO, B. M. et al. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-508.

RODRIGUES, R. S. O. Ponto de vista de uma indústria multinacional sobre o uso de produtos biológicos. In: WORKSHOP SOBRE A ANÁLISE DE RISCO E AVALIACAO DO IMPACTO AMBIENTAL DECORRENTES DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLOGICO, 1., 1995, Jaguariúna. **Anais...** Jaguariúna: EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente, 1995. P.127.

SHETLAR, D. J.; SULEMAN, P. E.; GEORGIS, R. Irrigation and use of entomogenous nematodes, *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae), for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. **Journal Economic Entomological**, Kansas, v.3, n.81, p. 1.311-1.318, 1998.

SILVA, M. T. B.; MOSCARDI, F. Field efficacy of the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepdoptera: Noctuidae): effect of formulations, water pH, volume and time of Application, and type of spray nozzle. **Neotropical Entomology**, New York, v.18, n.2, p.53-59, 2002.

SIMONS, W. R.; POINAR Jr, G. O. The ability of *Neoaplectana carpocapsae* (Steinernematidae: Nematodea) to survive extended periods of desiccation, **Journal Invertebrate Pathological**, Kansas, v.1, n.22, p. 222-228, 1973.

SOMERVILLE, H. J.; JAMES, C. R. Association of crystalline of *Bacillus thuringiensis* with the exosporium. **Journal Bacteriol**. New York, v.2, n.102, p. 580-583, 1970.

TIPLER, P. **Physics for scientists and engineers**, 3rd. New York: Worth Publishers, 1991. 299 p.

VILARINHOS, P. T. R. et al. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos. In: ALVES, B. S. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.447-487.

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae cultures. **Science**, Florida, v.4, n.66, p.302-303, 1927.

WRAIGHT, S.P.; BRADLEY, C.A. Production, formulation, and application technologies for use of entomopathogenic fungi to control field crop pests. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO – SICONBIOL, 5, 1996, Foz do Iguaçu. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 1996. p.170-177.