

RESPOSTA IMUNOLÓGICA E NUTRICIONAL DO PREDADOR *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM BIOINSETICIDAS E SUA
ASSOCIAÇÃO A PATÓGENOS

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

RESUMO

O controle biológico utiliza inimigos naturais para regular populações de pragas abaixo do seu nível de dano econômico. Enquanto que inseticidas botânicos, como a azadiractina, apesar de serem considerados seguros, demonstram ser prejudiciais aos inimigos naturais. Contudo, para um manejo efetivo de pragas, os métodos de controle utilizados devem agir de maneira sinérgica ou não interagir negativamente. Pensando nisso, avaliamos a resposta imune e nutricional de ninfas de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) pulverizadas com azadiractina (Azamax[®]) após 24h e 72h do tratamento, através da contagem de hemócitos, quantificação de óxido nítrico, atividade da fenoloxidase, quantificação de lipídeos, açúcares, glicogênio e proteínas totais. Verificamos, portanto, a redução de pró-hemócitos e oenócitoides, com consequente redução da atividade da fenoloxidase bem como redução dos níveis de óxido nítrico e proteínas, indicando interferência na síntese proteica. Ao observarmos esses resultados, analisamos então a toxicidade da azadiractina associada ou não aos patógenos *Metarhizium* (Metarril[®]) e *Bacillus* (Xentari[®]) comparados ao inseticida sintético deltametrina (Decis[®]), realizando a análise de sobrevivências de ninfas pulverizadas e alimentadas com presas tratadas com os compostos em laboratório, e taxa de mortalidade após plantas tratadas com os compostos. Apenas no tratamento de azadiractina com

Metarhizium em casa de vegetação observou-se aumento da mortalidade do predador. Assim, a azadiractina não demonstra ter um efeito agudo em *P. nigrispinus*, porém pode prejudicar seu sistema imune tornando-o mais suscetível à infecção por fungo, sendo necessário manobras de manejo que reduzam a suscetibilidade deste inseto em campo.

PALAVRAS-CHAVE: Percevejo, histoquímica, histofisiologia, sistema imune, nutrição, biopesticidas, controle biológico.

IMMUNOLOGICAL AND NUTRITIONAL RESPONSE OF THE *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) PREDATOR TREATED WITH
BIOINSETICIDE AND ITS ASSOCIATION WITH PATHOGENS

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

(Under the Supervision of Professor Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE)

ABSTRACT

Biological control uses natural enemies to regulate populations of pests below their level of economic damage. While botanical insecticides such as azadirachtin, although considered safe, are showing to be harmful to natural enemies. However, for effective pest management, the control methods used should act synergistically or without negative interaction. In this study, we evaluated the immune and nutritional response of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs sprayed with azadirachtin (Azamax[®]) after 24h and 72h of treatment, by counting hemocytes, nitric oxide quantification, phenoloxidase activity, quantification of lipids, sugars, glycogen and total proteins. Therefore, the reduction of pro-hemocytes and oenocytes was observed, with consequent reduction of phenoloxidase activity as well as reduction of nitric oxide and protein levels, indicating interference in protein synthesis. When we observed these results, we then analyzed the toxicity of azadirachtin associated with *Metarhizium* (Metarril[®]) and *Bacillus* (Xentari[®]) pathogens compared to the synthetic insecticide deltamethrin (Decis[®]), performing the analysis of survival of nymphs sprayed and fed with treated prey with the compounds in the laboratory, and mortality rate after plants treated with the compounds. Only in the treatment of azadirachtin with *Metarhizium* in greenhouse was observed an increase in predator mortality.

Thus, azadirachtin does not show an acute effect on *P. nigrispinus*, but it may impair its immune system making it more susceptible to fungus infection, requiring management maneuvers that reduce the susceptibility of this insect in the field.

KEY WORDS: Stinkbug, histochemistry, histophysiology, immune system, nutrition, biopesticides, biological control.

RESPOSTA IMUNOLÓGICA E NUTRICIONAL DO PREDADOR *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM BIOINSETICIDAS E SUA
ASSOCIAÇÃO A PATÓGENOS

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

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

RECIFE - PE

Fevereiro – 2019

RESPOSTA IMUNOLÓGICA E NUTRICIONAL DO PREDADOR *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM BIOINSETICIDAS E SUA
ASSOCIAÇÃO A PATÓGENOS

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

Comitê de Orientação:

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Franklin Magliano da Cunha - FAFIRE

RESPOSTA IMUNOLÓGICA E NUTRICIONAL DO PREDADOR *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) TRATADOS COM BIOINSETICIDAS E SUA
ASSOCIAÇÃO A PATÓGENOS

por

CRISTIANE THALITA DOS SANTOS SILVA

Orientador: _____
Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Examinadores: _____
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Glaucilane dos Santos Cruz – PNPd/CAPES

Franklin Magliano da Cunha – FAFIRE

Thiago José de Souza Alves – UNIBRA

DEDICO

À minha mãe, Izabel Cristina Santana do Nascimento, que sempre se dedicou e torceu pela minha felicidade. E à minha tia, Marta Maria Santana do Nascimento (*in memoriam*), pelo seu exemplo como educadora e de perseverança nos momentos de maior sofrimento.

OFEREÇO

A toda minha família, pelos valores que me fazem ser quem sou.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) por serem públicos e graças a isto eu pude realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

À minha orientadora, Valéria Wanderley Teixeira, juntamente ao meu co-orientador, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pela oportunidade, credibilidade, paciência e carinho ao longo desses anos na minha formação profissional. Meu muito obrigada.

Ao meu co-orientador, Franklin Magliano da Cunha, pelos ensinamentos, conselhos, amizade, apreço e dedicação desde a minha graduação.

Ao Thiago José de Souza Alves, a quem tenho como irmão, pelo incentivo todas as vezes que quis desistir e suporte nesta pesquisa. O qual nunca mediu esforços para me ajudar. Agradeço de coração. Mais ainda por sua amizade.

Ao Professor Dr. Manoel G. C. Gondim Júnior, do laboratório de Acarologia (PPGEA), pela disponibilidade dos equipamentos que permitiram a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Wagner Melo, pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho

À Unidade de Controle Biológico da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande – PB, pelo fornecimento de insetos que foram utilizados neste trabalho para estabelecimento da criação. E assim, à Aline Cristina Silva Lira, por ter sido a conexão com eles.

Aos amigos e colegas do PPGEA, em especial, Tayron, Luna, Jefferson, Alessandra, Amanda, Lucas, pelo suporte durante as disciplinas.

A todos que fazem/fizeram parte do laboratório de Fisiologia de Insetos, durante o período de realização deste curso, por terem tornado os dias mais divertidos com suas companhias, mesmo em meio a todas as dificuldades. Obrigada Andrezo, Carolina, Clara, Hilton, Jeff, Kamilla, Maria, Matheus, Uriel e Victor.

À mestranda Valeska A. Ático Braga, pelo suporte durante a realização dos experimentos, e fora deles também. Pela parceria na manutenção da criação e na militância. Por ser um aperreio na minha vida, mas aquele aperreio que a gente sempre quer bem. Gostaria de ter retribuído mais.

À PNPd Glaucilane dos Santos Cruz, que mesmo com tantas divergências, aprendemos a lidar com as diferenças e, assim, construir uma amizade. Sou muito grata, seja pelas orações, pelas palavras de encorajamento, assim como no apoio à esta pesquisa, a qual não faz parte de suas obrigações, mas nunca se recusou.

Aos meus amigos, Jordy, Ronald e Widma, por fazerem parte da minha vida e não desistirem de mim. Amo vocês.

Aos meus amigos virtuais e companheiros de LoL, Aqua, Obi, GaAlex, Shiro, Arturex, Dantas, Lothoz, Mashiro, Euryale, Manuk Mio, DiMaria, Osnânio e Nazar, obrigada por animarem meus dias.

Aos meus amigos e colegas do RPG, Geraldo, Silmar, Raísa, Carlos, Priscila, Flavson, pelas muitas campanhas que enfrentamos e por torcerem por mim.

Ao meu companheiro, Felipe Wagner Pereira de Sena, pelo amor, zelo, amizade e apoio incondicional. Agradeço todos os dias por ter essa pessoa incrível ao meu lado.

À toda minha família, em especial à minha tia Maria de Fátima Santanda do Nascimento, pelo carinho de mãe que sempre teve por mim. E à minha mãe, Izabel Cristina Santana do Nascimento, por tudo que tenho e sou. Sou eternamente grata.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA.....	9
2 RESPOSTA IMUNE E NUTRICIONAL DE NINFAS DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) PULVERIZADAS COM AZADIRACTINA.....	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
AGRADECIMENTOS.....	30
LITERATURA CITADA.....	30
3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA AZADIRACTINA ASSOCIADA A BIOPESTICIDAS EM NINFAS DE <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) EM LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47

INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO.....	55
AGRADECIMENTOS.....	58
LITERATURA CITADA.....	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional tem aumentado a demanda por alimentos e produtos industriais, no qual os sistemas agrícolas são responsáveis por fornecer ao homem grande parte do abastecimento desses produtos. No entanto, diversos problemas têm ocorrido principalmente na monocultura, como a ocorrência de doenças e surtos de pragas, causando assim, perturbação ambiental e ecológica (Zanuncio *et al.* 1994, Isman 2006).

Em regiões tropicais, os cultivos apresentam uma diversidade de inimigos naturais (parasitoide, predador e entomopatógenos) bastante rica. Contudo, ações inadequadas na condução destes cultivos, sobretudo no controle de pragas e doenças, podem ocasionar prejuízo na ação benéfica desses organismos (Ramalho & Wanderley 1996, Bueno *et al.* 2017). Acrescido das recentes preocupações dos possíveis danos ambientais e ecológicos decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos levou-se à busca de alternativas viáveis ao uso dos produtos sintéticos nesses sistemas (Zanuncio *et al.* 1994, Isman 2006).

Devido então à necessidade de um sistema de produção agrícola que considere a sustentabilidade ambiental e que demande a biodiversidade no agroecossistema, foi instaurado o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que busca de forma racional o controle dos insetos-praga das culturas através da utilização de processos naturais e redução de defensivos agrícolas. Contudo, mesmo o MIP tendo diferentes métodos de controle sendo usados de maneira integrada, os mais utilizados ainda são os defensivos químicos e os agentes de controle biológico (Simonato *et al.* 2014).

O controle natural pelo uso de inimigos naturais tem importante papel no programa do MIP, com a finalidade do equilíbrio populacional de insetos-praga (Molina-Rugama *et al.* 1997). A preservação dos inimigos naturais nos agroecossistemas é necessária a fim de obter um controle biológico eficiente, evitando problemas de resistência e dependência do uso de inseticidas sintéticos, causando menos impactos ao meio ambiente e contaminação humana (Scudeler *et al.* 2013), uma vez que quanto menos inseticidas utilizados, menor a probabilidade de serem consumidos pelos predadores e os efeitos tritróficos nesta guilda.

Dentre os inimigos naturais, os predadores são considerados a primeira linha de defesa das plantas contra os fitófagos, e podem ocorrer normalmente em baixas populações nos agroecossistemas, dependendo da abundância e da qualidade da presa (Whitcomb 1981, Oliveira *et al.* 2002).

Diversas espécies de percevejos Pentatomidae (Asopinae) têm ganhado destaque como predadores de várias ordens de insetos de importância econômica (Pereira *et al.* 2008), os quais inserem seus estiletos bucais no corpo da presa, paralisando-a de forma progressiva (Azevedo *et al.* 2007).

A subfamília Asopinae tem sido evidenciada em todo mundo com potencial para o controle de pragas, tanto nos sistemas agrícolas, como em florestas (Legaspi *et al.* 1996, De Clercq *et al.* 1998, De Clercq 2000, Zanuncio *et al.* 2000). Com destaque para o gênero *Podisus*, descritos com populações de predadores generalistas associadas ao final do surto de lagartas desfolhadoras de soja (Corrêa-Ferreira & Moscardi 1995) e de eucalipto (Torres *et al.* 1996).

Podisus nigrispinus (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae), é uma espécie Neotropical, que ocorre da Argentina à Costa Rica (Thomas 1992), e pode ser encontrada em diferentes culturas predando diferentes insetos-pragas, tanto larvas de Lepidoptera como Coleoptera (Medeiros *et al.* 2004). Com mais de 34 espécies de importância econômicas predadas, são associados,

principalmente, a lepidópteros-praga da família Noctuidae (Oliveira *et al.* 2004, Torres *et al.* 2006a).

Sendo uma espécie nativa do Brasil, pode ocorrer naturalmente em diferentes condições ambientais na maioria dos estados brasileiros onde o algodão é plantado (Medeiros *et al.* 2004), considerada uma espécie potencial para programas de controle biológico de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Erebidae), em plantios de soja e algodão, respectivamente (Ferreira *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2009). É encontrada também predando diferentes pragas do tomateiro, apresentando alto potencial de predação de lagartas da traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), em laboratório (Salas 1996) e de *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivos protegidos (de Clercq *et al.* 1998, de Clercq *et al.* 2000), e ninfas e adultos predando *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivo orgânico de brássicas (Silva-Torres *et al.* 2010).

O ciclo de vida, métodos de criação massal, preferência por presas, desenvolvimento em dietas artificiais, características reprodutivas, sobrevivência e taxa de predação, desses percevejos predadores têm sido estudados (Molina-Rugama *et al.* 1998, Medeiros *et al.* 2000, Molina-Rugama *et al.* 2001, Medeiros *et al.* 2003, Torres *et al.* 2006b).

O ciclo de vida de *P. nigrispinus* apresenta a fase de ovo de 5 a 6 dias, cinco estádios ninfais de 17 a 20 dias, e a fase adulta de 30 a 85 dias, quando criados entre 25-27 °C, 70-85 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. Tanto as ninfas como os adultos desse percevejo são predadores, que os torna disponíveis no campo de 47 a 105 dias efetuando o controle de pragas. As ninfas de primeiro e segundo instares possuem cor marrom escuro, e no terceiro, quarto e quinto instares passam para a cor vermelha e preta. É possível diferenciar os adultos das ninfas, devido a presenças de asas, do tipo hemiélitro, e espinhos laterais no pronoto. Os machos,

geralmente, são menores que as fêmeas e apresentam coloração esverdeada. Já as fêmeas variam de cor marrom-avermelhada ou pálido-esverdeada. A oviposição é feita em pequenas massas, podendo ter até 40 ovos. Durante todo o ciclo de vida, uma fêmea pode ovipositar de 81 a 300 ovos (Torres *et al.* 2006b, Simonato *et al.* 2014).

Nos agroecossistemas, diversos inimigos naturais podem ocorrer simultaneamente atacando diferentes ou o mesmo inseto alvo (França *et al.* 2006). Além dos insetos entomófagos (parasitoides e predadores), outros agentes de controle biológico são utilizados e encontrados em diversos ecossistemas merecendo destaque, os entomopatógenos, composto por fungos, bactérias e vírus entomopatogênicos, além de outros organismos como nematoides e microsporídeos (Vega & Kaya 2012)

França *et al.* (2006) preconizam a necessidade do estudo das interações entre os diferentes agentes de controle biológico, pois a relação entre eles pode ocorrer diretamente durante as aplicações, ou mesmo indiretamente, ao entrarem em contato com plantas tratadas ou ao se alimentarem de presas infectadas pelos entomopatógenos. Estes mesmos autores, constaram uma maior mortalidade corrigida ($37,5 \pm 6,52$ %) do predador *P. nigrispinus* tratados topicamente com 0,5 µL de suspensão na concentração de 10^7 conídios/mL do fungo *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok., do que a mortalidade provocada por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ($24,6 \pm 4,98$ %) e por outras via, como residual seco e ingestão de presas contaminadas, sugerindo um cuidado criterioso no uso integrado com o percevejo.

Aliado aos métodos do MIP, o ressurgimento do estudo das plantas repelentes e com efeito inseticida para o controle de insetos-pragas tem se destacado, devido às inúmeras vantagens do emprego de suas substâncias extraídas, na qualidade de inseticidas, quando comparadas ao uso de sintéticos por serem: obtidas de recursos renováveis; rapidamente degradáveis; com lento desenvolvimento de resistência, em decorrência de serem compostos da associação de vários

princípios ativos; de fácil acesso e obtenção por agricultores; não deixarem resíduos em alimentos; e poderem ser mais rentáveis (Vendramim & Castiglioni 2000, Roel 2001, Maia & Parente-Júnior 2008).

Devemos ressaltar que os produtos naturais oferecem uma grande abundância de moléculas com grande diversidade nas suas estruturas e atividade biológica (Reigosa & Pedrol 2002), interagindo com novos sítios de ação nos organismos-alvos, indicando alternativas para a síntese de novos produtos (Duke *et al.* 2000). Como é o caso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss), planta originária da Ásia, natural de Burma e das regiões áridas do subcontinente indiano (Martinez 2002, Neves *et al.* 2003), que tem sido alvo de grande interesse agrícola devido à presença de um composto secundário limonóide, a azadiractina, presente tanto nas folhas, como frutos e sementes, com atividade sobre alguns insetos comparável aos melhores inseticidas sintéticos encontrados no mercado (Schmutterer 1990, Roel 2001). Sua descoberta pela ciência ocidental é atribuída a Schmutterer (1990), ao observar gafanhotos do deserto no Sudão desfolhar quase toda a flora local, com exceção de algumas árvores introduzidas de Nim (National Research Council 1992). Assim, os compostos produzidos pelo nim, como a azadiractina, se tornaram rapidamente, nos EUA, modelo para o desenvolvimento de inseticidas botânicos (Weinzierl 2000).

Atualmente, a azadiractina é considerada um dos inseticidas naturais mais importantes, com grande sucesso no controle de pragas em zonas tropicais e temperadas (Schmutterer 1990), e capacidade de atuar como um anti-alimentar, regulador de crescimento e esterilizante de artrópodes, de uso classificado como seguro para os vertebrados (Isman 2006, Mordue *et al.* 2010).

A toxicidade da azadiractina já foi reportada em mais de 500 espécies de insetos, e seu uso no MIP tem sido relacionado principalmente pela contaminação por ingestão mais do que pelo contato (Martinez & van Emden 2001, Roy *et al.* 2010). Diversos são os seus efeitos provocados

nos insetos, como repelência, inibição de desenvolvimento e ecdise, retardo no desenvolvimento, redução da fertilidade e fecundidade, alterações comportamentais e fisiológicas, capazes de provocar a morte, além de alterações hormonais que provocam perturbações do desenvolvimento, deformações e infertilidade. Sendo a dose utilizada e o tempo de exposição determinantes da extensão dos efeitos e seu tempo de reação (Martinez 2002, El-Wakeil 2013).

Tanto o óleo, como os extratos ou o pó de sementes, folhas e ramos do Nim têm sido avaliados no controle de pragas [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Martinez 2002, Boeke *et al.* 2004]. Contudo, é de grande importância estudar os efeitos secundários dos pesticidas sobre artrópodes benéficos, a fim de testar as técnicas adequadas e métodos padronizados, que são urgentemente necessários, para melhor gerir o manejo integrado de pragas (Kakakhel & Hassan 1998).

Segundo Roel (2001), alguns bioinseticidas citados no seu artigo apresentaram toxicidade em animais de sangue quente, como por exemplo, os extraídos da família Annonaceae. Assim como, alguns compostos derivados de vegetais podem causar prejuízos a insetos úteis às plantas e ao homem, tais como polinizadores, inimigos naturais de pragas e abelhas. Outro fato a ser considerado é a maneira pela qual os inimigos naturais entram em contato com os inseticidas botânicos, o que pode significar certas limitações ao uso desses compostos no Manejo Integrado de Pragas.

Carvalho (2009) evidenciou uma redução na sobrevivência das ninfas de *P. nigrispinus* de segundo ínstar menor que 5 %, após imersão, nas concentrações de 3 e 5 % de nim. Quanto às alterações comportamentais, Oliveira *et al.* (2012), ao avaliarem o efeito da azadiractina sobre o acasalamento deste inseto, obtiveram um maior tempo médio efetivo de acasalamento por afetar a duração da primeira copula (teste de Wilcoxon, $\chi^2=13,38$, $df=3$, $p=0,004$). Campos *et al.* (2014), verificaram que o óleo de nim reduziu a capacidade predatória de ninfas e adultos de *P.*

nigrispinus nas concentrações de 0,359 e 0,599 %, sendo o período ninfal alongado de 3,32 dias para 4,5 dias no terceiro instar na primeira concentração, e redução de peso dos machos (28,24 mg) na segunda em relação ao peso encontrado na concentração de 0,077 % (46,80 mg).

Quanto às alterações fisiológicas em insetos, trabalhos que utilizaram o óleo de nim ou mesmo a azadiractina, mostraram redução no número de células regenerativas do intestino médio, o qual inibiu a ocorrência de mitose (Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Reed & Majumdar 1998). Proskuryakov *et al.* (2003) e Ryter *et al.* (2014) também sugerem que as alterações celulares ocasionadas pelo uso do óleo de nim ou de derivados vegetais em células colunares intestinais vão de encontro com várias modificações celulares indicativas de morte celular por necrose: como alterações nas microvilosidades, ruptura da membrana plasmática, vacuolização do citoplasma, formação e ampliação de espaços intercelulares, despolimerização da actina levando a alterações no citoesqueleto, além de outros efeitos (Correia *et al.* 2009, Almehmadi 2011, Scudeler & Santos 2013, Scudeler *et al.* 2014).

Em relação às alterações em predadores, Scudeler *et al.* (2014) verificaram que o óleo de nim provocou efeitos citotóxicos no intestino médio em larvas de *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera: Chrysopidae), apresentando muitas protrusões citoplasmáticas, agrupamento e ruptura das microvilosidades, células inchadas, ruptura de células, dilatação e vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, desenvolvimento de retículo endoplasmático liso, aumento dos espaços extracelulares do labirinto (invaginação) basal, espaços intercelulares e necrose.

A maioria dos estudos tem se preocupado apenas com o contato direto dos inseticidas botânicos, e a exposição indireta através da ingestão de presas contaminadas raramente tem sido considerada para os inimigos naturais, apesar de alguns trabalhos já terem demonstrado os efeitos de botânicos em predadores e parasitoides (Qi *et al.* 2001, Ahmad *et al.* 2003). Contudo, são consideravelmente raras pesquisas que verifiquem os efeitos desses inseticidas na imunidade dos

inimigos naturais, mesmo sabendo-se que alterações no sistema imune podem causar efeitos diretos e indiretos na sobrevivência, captação de recursos, reprodução e capacidade de realizar o controle de forma efetiva.

O sistema imunológico dos insetos é composto por barreiras estruturais (exoesqueleto e sistema digestório) e por respostas ativas contra elementos estranhos. Quando essas barreiras estruturais são rompidas, os agentes estranhos atingem a hemocele desencadeando complexos e interconectando mecanismos celulares e humorais. As defesas celulares são mediadas por células livres circulantes na hemolinfa, os hemócitos, e referem-se às respostas imunes como fagocitose, nodulação, encapsulação e citotoxicidade (Schmid-Hempel 2005).

Sabe-se que a ocorrência de esterilidade em insetos pode estar associada a distúrbios alimentares e deficiência nutricional. A alimentação na fase jovem do inseto pode influenciar o número de ovários por ovário, e o desenvolvimento do ovário depende da disponibilidade de glicolipoproteínas fornecidas pelo corpo gorduroso e sequestradas pelos oócitos. A redução do número de ovos e a inibição da oviposição são importantes efeitos de extratos vegetais sobre a reprodução dos insetos (Sayah *et al.* 1996).

Ghazawi *et al* (2007) ao avaliarem o efeito tóxico de azadiractina a 10 µL de 25 ppm de azadiractina em *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae), observaram que as fêmeas apresentaram os ovários reduzidos, com óocitos com o crescimento cessado e desintegração e destruição das células foliculares, enquanto que nos machos houve deformação dos tubos espermáticos e epitélio testicular e espermátides desintegradas.

Em estudo realizado nos ovários de fêmeas de *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) tratadas com azadiractina, constataram que há interferência na síntese vitelogenina e absorção de vitelogenina pelos oócitos em desenvolvimento. Também verificaram que os folículos de fêmeas tratadas eram menores do que os de fêmeas não tratadas (Medina *et al.* 2004).

Para que se estabeleça o manejo de pragas adequado para uma praga ou cultura utilizando-se de biopesticidas, é necessário avaliar os impasses relacionados à sua utilização, e se a interação entre os diferentes métodos podem gerar efeitos indesejados, como causar dano aos inimigos naturais presentes na área. Pensando nisto, este trabalho busca elucidar as alterações provocadas no sistema imune de *P. nigrispinus* ao serem expostos a azadiractina (Azamax[®]), produto de origem natural, se este pode influenciar na sua nutrição, bem como na fisiologia reprodutiva, comparado ao inseticida sintético. E ainda, avaliaremos se este produto, associado a formulados a base de entomopatógenos (Metarril[®] e Xentari[®]) é capaz de afetar a capacidade predatória deste predador.

Literatura Citada

- Ahmad, M., H.R., Obiewatsch & T. Basedow. 2003.** Effects of neem-treated aphids as food/hosts on their predators and parasitoids. *J. Appl. Entomol.* 127: 458-464.
- Almehmadi, R.M. 2011.** Larvicidal, histopathological and ultra-structure studies of *Matricharia chamomella* extracts against the rift valley fever mosquito *Culex quinquefasciatus* (Culicidae:Diptera). *J. Entomol.* 8:63-72.
- Azevedo, D.O., J.C. Zanuncio, J.S. Zanuncio Jr., G.F. Martins, S. Marques-SilvaI; M.F. Sossai & J.E. Serrão. 2007.** Biochemical and morphological aspects of the predator *Brontocoris tabidus* Signoret, 1852 (Heteroptera, Pentatomidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50: 469-477.
- Boeke, S.J., M.G. Boersma, G.M. Alink, J.J.A. van Loon, A. van Huis, M. Dicke & I.M.C.M. Rietjens. 2004.** Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J. Ethnopharmacol.* 94: 25-41.
- Bueno, A.F., G.A. Carvalho, A.C. Santos, D.R. Soza-Gómez & D.M. Silva. 2017.** Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. *Ciênc. Rural* 47: 1-10.
- Campos, A.P., A. L.Boiça-Junior & Z.A. Ribeiro. 2014.** Indirect effect of neem oil on *Podisus nigrispinus* (Hemiptera, Pentatomidae): biology and predatory capacity. *Rev. Ceres* 61: 652-659.

- Carvalho, J.M. 2009.** Sobrevivência de ninfas de *Podisus nigrispinus* quando expostas a extratos de neem e cinamomo. RBA 4: 2360-2363.
- Corrêa-Ferreira, B.S. & F. Moscardi. 1995.** Seasonal occurrence and host spectrum of egg parasitoids associated with soybean stink bugs. Biol. Control 5: 196-202.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, A.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2009.** Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.
- De Clercq, P. 2000.** Predaceous stinkbugs (Pentatomidae: Asopinae), p.737-789. In C.W. Schaefer & A.R. Panizzi. (eds.), Heteroptera of Economic Importance. Cambridge, Cambridge University, 856p.
- De Clercq, P., F. Melevede, I. Mesidagh, K. Vandendurpel, J. Mohaghegh & D. Degheele. 1998.** Predation on the tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lep., Noctuidac) by *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 122: 93-98.
- De Clercq, P., J. Mohaghegh & L. Tirry. 2000.** Effects of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Biol. Control 18: 65-70.
- Duke, S.O., F.E. Dayan, & A.M. Rimando. 2000.** Natural products and herbicide discovery, p.105-133. In A.H. Cobb & R.C. Kirkwood (eds.), Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield, Academic Press, 320p.
- El-Wakeil, N.E. 2013.** Botanical Pesticides and Their Mode of Action. Gesunde Pflanz. 65:125-149.
- Ferreira, J.A.M., J.C. Zanuncio, J.B. Torres & A.J. Molina-Rugama. 2008.** Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) larvae. Biocontrol Sci. Technol. 18: 711-719.
- França, I.W.B., E.J. Marques, J.B. Torres & J.V. Oliveira. 2006.** Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Neotrop. Entomol. 35: 349-356.
- Ghazawi, N.A., E.D. El-Shranoubi, M.M. El-Shazly & K.M. Abdel Rahman. 2007.** Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). J. Orth. Res. 16:57-65.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.

- Kakakhel, S.A. & S.A. Hassan. 1998.** The side effects of pesticides on the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal, acute dose response. Pesticides and beneficial organisms. IOBC Bull. 21: 61-69.
- Legaspi, J.C., R.J. O'Neil & B.C. Legaspi. 1996.** Trade-offs in body weights, egg loads, and fat reserves of field-collected *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 25: 155-164.
- Maia, C.S. & W.C. Parente-Júnior. 2008.** Citronela, aliada natural para repelir pernilongos. Norte Científico 3: 1-7.
- Martinez, S. & H.F. van Emden. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. Neotrop. Entomol. 30: 113-125.
- Martinez, S.S. 2002.** O nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agronômico do Paraná, 142p.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, J.C. Zanuncio & J.E. Senão. 2003.** Effect of temperature on life table parameters of *Podisus nigrispinus* (Het., Pentatomidae) fed with *Alabama argillacea* (Lep., Noctuidae) larvae. J. Appl. Entomol. 127: 209-213.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, J.E. Serrão & J.C. Zanuncio. 2004.** Estimative of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera:Pentatomidae) development time with non linear models. Neotrop. Entomol. 33: 141-148.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, W.P. Lemos & J.C. Zanuncio. 2000.** Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). J. Appl. Entomol. 124: 319-324.
- Medina, P., F. Budia, P. Del Estal & E. Viñuela, 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. J. Econ. Entomol. 97:43-50.
- Molina-Rugama, A.J., J.C. Zanuncio, D. Pratisoli & I. Cruz. 1998.** Efeito do intervalo de alimentação na reprodução e na longevidade do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). An. Soc. Entomol. Brasil 27: 77-83.
- Molina-Rugama, A.J., J.C. Zanuncio, E. Vinha & F.S. Ramalho. 2001.** Daily rate of egg laying of the predator *Podisus rostralis* (Stål) (Heteroptera, Pentatomidae) under different feeding intervals. Rev. Bras. Entomol. 45: 1-5.
- Molina-Rugama, A.J., J.C. Zanuncio, J.B. Torres & T.V. Zanuncio. 1997.** Longevidad y fecundidad de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado con *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) y frijol. Rev. Biol. Trop. 45: 1125-1130.

- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Mordue A.J., E.D. Morgan & A.J. Nisbet. 2010.** Azadirachtin, a natural product in insect control. P. 185-203. In L.I. Gilbert & S.S. Gill (eds) *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. London, Academic Press, 490p.
- National Research Council. 1992.** *Neem: A tree for solving global problems*. Washington, DC, National Academy Press. 141p.
- Neves, B.P., I.P. Oliveira & J.C.M. Nogueira. 2003.** Cultivo e utilização do nim indiano. Goiânia, Embrapa Arroz e Feijão, 12p. (Circular Técnica, no. 62).
- Oliveira, H.N., M.C. Espindula, D. Pratisoli & E.P. Pedruzzi. 2004.** Ganho de peso e comportamento de oviposição de *Podisus nigrispinus* utilizando lagartas de *Spodoptera frugiperda* e larvas de *Tenebrio molitor* como presas. *Cienc. Rural* 34: 1945-1948.
- Oliveira, J.E.M., J.B. Torres, A.F. Carrano-Moreira & F.S. Ramalho. 2002.** Biologia de *Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. *Pesqu. Agropec. Bras.* 37: 7-14.
- Oliveira, S.O.D., W.F. Barbosa, K.S.V. Malqui & R.N.C. Guedes. 2012.** Mating behavior of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) under exposure to neem. *Chil. J. Agric. Res.* 72: 523-527.
- Pereira, A.I.A., F.S. Ramalho, C.M. Bandeira, J.B. Malaquias & J.C. Zanuncio. 2009.** Age-dependent fecundity of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) with sublethal doses of gamma-cyhalothrin. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 1157-1166.
- Pereira, A.I.A., F.S. Ramalho, J.B. Malaquias, C.M. Bandeira, J.P.S. Silva & J.C. Zanuncio. 2008.** Density of *Alabama argillacea* larvae affects food extraction by females of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae). *Phytoparasitica* 36: 84-94.
- Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov & V.L. Gabai. 2003.** Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 1:1-16.
- Qi, B., G. Gordon & W. Gimme. 2001.** Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol. Control* 22: 185-190.
- Ramalho, F. S. & P.A. Wanderley. 1996.** Ecology and management of cotton boll weevil in South American cotton. *Am. Entomol.* 42: 41-47.
- Reed, E. & S.K. Majumdar. 1998.** Differential cytotoxic effects of azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and mouse cultured cells. *Entomol. Exp. Appl.* 89: 215-221.

- Reigosa, M.J. & N. Pedrol. 2002.** Allelopathy: from molecules to ecosystems. Plymouth, Science Publishers, 316p.
- Roel, A.R. 2001.** Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Rev. Int. Desenv. Local 1:43-50.
- Roy, S., G. Gurusubramanian & A. Mukhopadhyay. 2010.** Neembased integrated approaches for the management of tea mosquito bug, *Helopeltis theivora* Waterhouse (Miridae: Heteroptera) in tea. J. Pest Sci. 83:143-148.
- Ryter, S.W., K. Mizumura & A.M.K. Choi. 2014.** The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities. Int. J. Cell Biol. 1:1-12.
- Salas, S.J.M. 1996.** Manejo integrado de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) através de inseticidas fisiológicos e *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae). Tese de Doutorado, Esalq, Piracicaba, 128p.
- Sayah, F., C. Fayet, M. Idaomar & A. Karlinsky. 1996.** Effects of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Dermaptera). Tissue Cell 28: 741-749.
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50: 529-551.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- Scudeler, E.L. & D.C. Santos. 2013.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navas, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). Micron 44: 125-132.
- Scudeler, E.L., C.R. Padovani. & D.C. Santos. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. Acta Histochem. 116:771-780.
- Silva-Torres, C.S.A., I.V.A.F. Pontes, J.B. Torres, R. Barros. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. Neotrop. Entomol. 39: 835-838.
- Simonato, J., J.F.J. Grigolli & H. N. Oliveira. 2014.** Controle biológico de insetos-praga na soja, p.178-193. In: A.L.F. Lourenção, J.F.J. Grigolli, A.M. Melotto, C. Pitol, D. de C. Gitti & R. Roscoe (eds.), Tecnologia e produção: Soja 2013/2014. Maracaju, Fundação MS, 247p.
- Thomas, D.B. 1992.** Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the western hemisphere. Lanham, Entomological Society of America, 156p.

- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006b.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* forest in Brazil. CAB Rev. 1: 1-18.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & T.V. Zanuncio. 1996.** Produção e uso de percevejos predadores no controle biológico de pragas florestais, p. 41-51. In Workshop sobre Proteção Florestal do Mercosul. Santa Maria, CEFET/UFSM, 80p.
- Torres, J.B., J.R. Ruberson & M.J. Adang. 2006a.** Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. Agric. For. Entomol. 8: 191–202.
- Vega, F.E. & H.K. Kaya. 2012.** Insect Pathology. 2nd. ed. San Diego: Academic Press, 490p.
- Vendramim, J.D. & E. Castiglioni. 2000.** Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas, p.113-128. In J.C. Guedes, I.D. Costa & E. Castiglioni (eds.) Bases e Técnicas do Manejo de insetos. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, 248p.
- Weinzierl, R.A. 2000.** Botanical insecticides, soaps, and oils, p.101–112. In: J.E. Rechcigl & N.A. Rechcigl (eds.), Biological and biotechnological control of insect pests. Boca Raton, Lewis Publishers, 392p.
- Whitcomb, W.H. 1981.** The use of predators in insect control, p.105-123. In D. Pimentel (ed.), CRC handbook of pest management in agriculture. Boca Raton: CRC Press, 624p.
- Zanuncio, J.C., J.B. Alves, T.V. Zanuncio & J.F. Garcia. 1994.** Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. For. Ecol. Manag. 65: 65-73.
- Zanuncio, J.C., T.V. Zanuncio, R.N.C. Guedes & F.S. Ramalho. 2000.** Effect of feeding on three *Eucalyptus* species on the development of *Brontocoris tabidus* (Het.: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae). Biocontrol Sci. Techn. 10: 443–450.

CAPÍTULO 2

RESPOSTA IMUNE E NUTRICIONAL DE NINFAS DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) PULVERIZADAS COM AZADIRACTINA ¹

CRISTIANE T.S. SILVA¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA¹⁻², GLAUCILANE S. CRUZ¹, FRANKLIN
M. CUNHA³ E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA^{2*}

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua
D. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

³Faculdade Frassinetti do Recife, Av. Conde da Boa Vista, 921, Boa Vista, 50060-002, Recife,
PE, Brasil

¹Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, F.M. Cunha & Á.A.C. Teixeira. Resposta imune e nutricional de ninfas de *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) pulverizadas com azadiractina. Submetido a Austral Entomology.

RESUMO - A azadiractina é reconhecida como um eficiente biopesticida no controle de pragas, e devido ao seu modo de ação ser principalmente por ingestão é reconhecido como seguro aos inimigos naturais. O predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) é encontrado em diversos agroecossistemas como potencial ferramenta no controle biológico. No entanto, a segurança desse percevejo concomitante ao uso do inseticida botânico azadiractina tem sido questionada. Assim, avaliamos a resposta celular e humoral, bem como a os parâmetros bioquímicos de ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* tratados com azadiractina. Os insetos foram divididos em três tratamentos e pulverizados em torre de Potter com azadiractina (Azamax[®]), deltametrina (Decis[®]), em suas doses de campo diluída em água, e apenas água, como controle. Após 24h foi realizada a contagem total e diferencial dos hemócitos. As análises da atividade da fenoloxidase, dosagem de óxido nítrico e quantificação de lipídio, açúcar, glicogênio e proteína foram avaliados após o intervalo de 24h e 72h. Foi verificado que a azadiractina afetou o sistema imune deste percevejo, reduzindo o número de hemócitos, em especial de pró-hemócitos e oenócitoides, o que pode ter provocado a redução da atividade da fenoloxidase e dosagem de óxido nítrico. Além de haver redução dos níveis de proteínas, indicando a interferência da azadiractina na síntese proteica. Embora os danos provocados pelo inseticida botânico tenham sido menos prejudiciais que os provocados pelo inseticida sintético, deltametrina, o uso da azadiractina pode interferir no controle biológico desse predador reduzindo sua eficiência.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticida botânico, controle biológico, imunidade inata, parâmetros bioquímicos, predador

IMMUNE AND NUTRITIONAL RESPONSE FROM NYMPHS OF *Podisus nigrispinus*

(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) SPRAYED WITH AZADIRACTIN

ABSTRACT – Azadirachtin is recognized as an efficient biopesticide in pest control, and due to its mode of action being mainly by ingestion is recognized as safe to natural enemies. The predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) is found in several agroecosystems as a potential tool in biological control. However, the safety of this bottleneck concomitant with the use of the botanical insecticide azadirachtin has been questioned. Thus, we evaluated the cellular and humoral response as well as the biochemical parameters of fifth instar nymphs of *P. nigrispinus* treated with azadirachtin. The insects were divided into three treatments and sprayed on Potter's tower with azadirachtin (Azamax[®]), deltamethrin (Decis[®]), at their field doses diluted in water, and only water as a control. After 24h, total and differential hemocyte counts were performed. Analyzes of phenoloxidase activity, nitric oxide dosage and quantification of lipid, sugar, glycogen and protein were evaluated after the 24h and 72h intervals. It was verified that azadirachtin affected the innate immune system, reducing the number of hemocytes, especially pro-hemocytes and oenocytes, which may have led to the reduction of phenoloxidase activity and nitric oxide dosage. In addition to reducing protein levels, indicating the interference of azadirachtin in protein synthesis. Although the damage caused by the botanical insecticide has been less harmful than those caused by the synthetic insecticide deltamethrin, the use of azadirachtin may interfere with the biological control of this predator by reducing its efficiency.

KEY WORDS: Botanical insecticide, biological control, innate immunity, biochemical parameters, predator

Introdução

A azadiractina é um composto triterpenoide limonóide produzido através do metabolismo secundário do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sendo o inseticida botânico mais utilizado no mundo, estando bem estabelecido na agricultura orgânica [Mordue (Luntz) & Nisbet 2000, Mordue *et al.* 2010]. Seu sucesso se deve ao fato de causar mortalidade e atuar como deterrente alimentar, regulador de crescimento e esterilizante em insetos-pragas, considerado seguro para vertebrados e para o uso concomitante ao de inimigos naturais (Isman 2006, Mordue *et al.* 2010).

Devido ao seu modo de ação estar relacionado com uma maior contaminação por ingestão do que por contato tópico em insetos pragas (Martinez & Van Emden 2001), o nim se mostra adequado para o uso nos programas do MIP, como demonstrado por Silva & Martinez (2004), onde a pulverização do óleo de nim na concentração 5 mL/L não causou mortalidade nos adultos de *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). Contudo, em condições de laboratório, os estádios ninfais ou larvais de alguns inimigos naturais tem se mostrado suscetíveis ao contato direto à azadiractina [Mordue (Luntz) & Blackwell 1993, Schmutterer 1997], o que pode significar certas limitações de seu uso no MIP. Devido a isto, a segurança da Azadiractina aos artrópodes não-alvos tem sido questionada (Qi *et al.* 2001).

Podisus nigrispinus Dallas (Heteroptera: Pentatomidae) é um percevejo zoofitófago nativo do Brasil, e pode ser encontrado em ecossistemas florestais e agrícolas predando diferentes insetos-pragas, principalmente larvas de Lepidoptera e Coleoptera (Medeiros *et al.* 2004, Torres *et al.* 2006). Considerada uma espécie potencial para programas de controle biológico de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) plantios de soja (Ferreira *et al.* 2008), *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) algodão (Pereira *et al.* 2009), *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivos protegidos (de Clercq *et al.* 1998, de Clercq *et al.* 2000), e

Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivo orgânico de brássicas (Silva-Torres *et al.* 2010).

Recentemente, Zanuncio *et al.* (2017) reportaram que apesar do óleo do nim apresentar baixa toxicidade a *P. nigrispinus*, este produto provocou em doses altas e subletais mortalidade, inibição do crescimento, e malformações, como deformações nas pernas e asas, em ninfas e adultos deste predador, reforçando o cuidado ao avaliar o uso associado do nim ao controle biológico. Porém as causas para tais efeitos ainda não são conhecidas.

Os insetos, assim como outros artrópodes, possuem um sistema imune inato controlado por vias de sinalização que são notavelmente bem conservadas no decorrer de sua evolução, e ainda assim eficientes. Caso as barreiras estruturais (tegumento e intestino) sejam rompidas, fazendo com que agentes estranhos atinjam a hemocele, mecanismos complexos e interconectados celulares e humorais são desencadeados (Lavine & Strand 2002, Schmid-Hempel 2005).

As defesas celulares são mediadas pelas células presentes na hemolinfa, os hemócitos (Schmid-Hempel 2005), enquanto que as defesas humorais incluem a ativação transcricional de genes que leva à produção de peptídeos antimicrobianos, intermediários reativos de oxigênio ou nitrogênio, e as complexas cascatas enzimáticas que regulam melanização da hemolinfa (Lavine & Strand 2002, Schmid-Hempel 2005, Eleftheriano & Revenis 2011).

É importante ressaltar que o contato com xenobióticos é capaz de causar estresse em insetos, desencadeando as defesas imunitárias e provocando gasto energético para manutenção de suas atividades fisiológicas e sobrevivência. Portanto, para que o MIP seja eficaz, é necessário estudar os efeitos secundários de pesticidas, mesmo os de origem botânica, sobre os insetos benéficos, já que a segurança desse percevejo concomitante ao uso do inseticida botânico azadiractina tem sido questionada. Assim, este trabalho avaliou os efeitos da azadiractina na resposta imune e nutricional de *P. nigrispinus*, comparada ao inseticida sintético deltametrina.

Material e Métodos

Obtenção e Criação de *Podisus nigrispinus*. Os percevejos foram fornecidos da Unidade de Controle Biológico da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande – PB, e estabelecida à criação no Laboratório de Fisiologia de Insetos (LAFI) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife – PE, matinda em câmaras climatizadas do tipo D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a 25 ± 1 °C, 53 ± 5 % de U.R. e fotofase de 12 h, alimentados com larvas e pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), de acordo com a metodologia proposta por Torres *et al.* (1996).

Bioensaios. Para os experimentos, foram utilizadas ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* (com até 48 h de idade) para cada tratamento.

Os experimentos constaram de três tratamentos, onde foram aplicadas suas doses recomendadas de campo para as lagartas *Spodoptera frugiperda* e *Plutella xylostella*, segundo o Agrofit (2018): azadiractina (AzaMax[®], 12 g de i.a./L), 300 mL/ha; deltametrina (Decis[®] 25 g de i.a./L EC), 200 mL/ha, devido ao seu uso difundido no controle de pragas nos sistemas agrícolas e considerado seletivo para o predador em questão; e apenas água destilada, como controle.

Em placas de Petri foram colocadas duas ninfas por vez e pulverizadas 2 mL em Torre de Potter, no laboratório de Acarologia do Departamento de Agronomia da UFRPE. Sendo utilizadas em média 60 ninfas para o tipo de material coletado para cada tratamento (macerado ou hemolinfa), totalizando o uso de aproximadamente 900 insetos para todos os bioensaios. Logo após, estas eram acondicionadas individualmente em tubos cilíndricos de vidro vedados com plástico filme, nos quais foram fornecidas uma bolinha de algodão umedecida com água e uma larva de tenébrio, sempre que necessário, até a coleta do material a ser utilizado para análise.

Coleta de Hemolinfa para Contagem de Hemócitos. Pernas e/ou antenas dos percevejos foram cortadas com auxílio de uma tesoura e com uma micropipeta automática (Labmate) foi coletado um *pool* de 5µL de hemolinfa de 2-4 insetos, com as ponteiros previamente preenchidas com 5µL do anticoagulante ou tampão fosfato gelado, após 24 h de aplicação.

Contagem Total de Hemócitos. 5 µL de tampão fosfato 0,1mM pH 7,4 foram acrescentados ao pool de 5µL da hemolinfa (1:1), e este foi depositado cuidadosamente entre a câmara de Neubauer e a lamínula para a contagem total dos hemócitos realizada em microscópio Olympus® BX-41 em objetiva de 40x. Sendo realizadas 10 repetições por tratamento.

Contagem Diferencial de Hemócitos. 5µL de anticoagulante (solução salina balanceada de Hanks modificada) foram acrescentados ao *pool* de 5µL da hemolinfa (1:1). Em seguida, o material foi colocado sobre uma lâmina microscópica previamente higienizada com álcool 70%, e realizado o esfregão. Este foi deixado em temperatura ambiente para secagem e melhor adesão dos hemócitos na lâmina e logo após corados com o Kit Panótico Rápido (Laborclin). Foram feitas 10 lâminas por tratamento, estas foram montadas com Entellan e então realizada a contagem diferencial seguindo metodologia modificada de Falleiros *et al.* (2003), na qual 300 células foram contadas e diferenciadas aleatoriamente por lâmina em objetiva de 100x no microscópio Olympus BX-41 (São Paulo, Brasil). As imagens para a confecção da prancha de hemócitos foram obtidas no microscópio Leica® DM500 (São Paulo, Brasil).

Preparação do Macerado. Três ninfas foram maceradas em 1 mL de tampão fosfato 0,1 mM pH 7,4 em um cadinho com auxílio de pistilo de porcelana. O macerado foi alocado em um tubo para centrifuga de 2 mL e centrifugado durante 1 min a 1000 rpm, para retirada de fragmentos de exoesqueleto dos insetos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 2 mL e mantidos refrigerados a -20 °C até a análise. Cada tratamento constou de 10 repetições nos intervalos de 24 e 72 h após aplicação.

Atividade da Fenoloxidase. Após 24 h de experimento um *pool* de 10 μL de hemolinfa foi diluído em 90 μL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, mantido refrigerado. Duplicatas de 50 μL desta mistura foram transferidas para placa de microtitulação. Foi adicionado em cada poço 50 μL de L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a ativação da enzima. Absorbância foi feita na leitora de microplaca Biochrom Anthos 2010 (São Paulo, Brasil) a 492 nm com o programa ADAP em modo fotometria cinética, onde atividade da enzima foi tomada durante a fase linear da reação em intervalos de 60 s durante 20 minutos, segundo Faraldo *et al.* (2006). Também foi realizada a análise de cada tratamento com 10 μL do macerado, após 24 h de aplicação. Cada tratamento constou de cinco repetições em seus respectivos tipos de biomaterial extraído.

Foi verificado que havia atividade da fenoloxidase no macerado após 24 h e que não havia diferença significativa entre o tipo de biomaterial com diferente extração. Então, a fim de viabilizar os experimentos, devido à grande quantidade de insetos que seriam necessários para extração de hemolinfa, no intervalo de 72 h após aplicação, foram analisadas apenas amostras do macerado, onde cada tratamento constou de 10 repetições.

Dosagem de Óxido Nítrico. Foi utilizado o reagente de Griess (Green *et al.* 1981), avaliado pela concentração do íon nitrito (NO_2^-). Um *pool* de 50 μL do macerado foi acrescido 70 μL de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) (5%). Após incubação, 50 μL da amostra (macerado/sulfanilamida) mais 50 μL de NEED (dihidroclorito de naftiletilenoamina) a 0,1 % em placa de microtitulação (Faraldo *et al.* 2005). A leitura da absorbância foi realizada a 562 nm na leitora de microplaca Biochrom Anthos 2010 (São Paulo, Brasil) com o programa ADAP em modo endpoint.

Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos. *Lipídio, açúcar e glicogênio totais.* Em tubo de ensaio de 2 mL foram colocados 200 μL do macerado acrescidos de 200 μL de sulfato de sódio 2 % e

800 µL de metanol:clorofórmio (1:1), e centrifugado a 2000 rpm durante 2 min. O precipitado foi utilizado para a análise de glicogênio, e o sobrenadante transferido para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 600 µL de água destilada e após centrifugado por mais 2 min, foram separados açúcar e lipídio.

Os lipídios totais foram dosados através do método ácido fosfórico-vanilina, enquanto que açúcar e glicogênio usando o método de ácido sulfúrico-antrona. A absorbância foi lida em duplicata a 625 nm em espectrofotômetro BelPhotonics SP 2000 UV (São Paulo, Brasil) (Van Handel 1985a, b).

Proteína total. Para se ajustar à curva, 25 µL da amostra do macerado foi acrescido de 75 µL de tampão fosfato. Para quantificação de proteína foi utilizado o método de Bradford (1976) e as leituras feitas em duplicata foram obtidas em espectrofotômetro BelPhotonics SP 2000 UV (São Paulo, Brasil) a 595 nm.

Análise Estatística. Os dados da contagem total de hemócitos assumiram normalidade e homogeneidade, e então foram submetidos à ANOVA onde as médias de cada tratamento foram obtidas e comparadas pelo teste de Tukey HSD ($P < 0,05$).

Na contagem diferencial, para os tipos celulares: adipohemócito, esferulócito, granulócito e plasmatócito, foram submetidos à ANOVA. Obtidas as médias entre os tratamentos, estas foram comparadas através do teste de Tukey HSD ($P < 0,05$). Em relação aos pró-hemócitos e oenocitóides, devido aos dados não assumirem normalidade e homogeneidade, as médias foram obtidas e comparadas através do teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Para atividade da fenoloxidase foi feita a análise fatorial, no tempo de 24 h após aplicação sendo comparada a forma de extração, tratamento e tempo. Logo após, as médias foram obtidas e comparadas através do teste de Tukey HSD ($P < 0,05$). No intervalo de 72 h, além da análise fatorial, tratamento e tempo, foi feita a análise de regressão não linear ($P < 0,05$).

Os dados dos parâmetros bioquímicos e dosagem de óxido nítrico, por assumirem normalidade e homogeneidade, após obtenção das médias de cada tratamento, foram submetidas ao teste de Tukey HSD ($P < 0,05$).

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS, versão 9.0 (SAS Institute 2008).

Resultados e Discussão

As ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* do controle apresentaram maior número de hemócitos que os insetos tratados com azadiractina e deltametrina, não havendo diferença entre os tratamentos com os inseticidas botânico e sintético ($F = 16,23$; $P < 0,0001$) (Tabela 1). A redução de hemócitos provocadas pelos inseticidas mostra que ambos são capazes de afetar o sistema imune deste percevejo, uma vez que estas células são responsáveis pela resposta celular nos insetos, ao realizarem fagocitose, nodulação e encapsulamento de substâncias estranhas e patógenos, e seu número e tipos celulares influenciam no sucesso desses mecanismos (Schmidt *et al.* 2001, Russo *et al.* 2001).

Em todos os tratamentos foram visualizados seis tipos celulares na hemolinfa de ninfas de *P. nigrispinus*: adipohemócitos, esferulócitos, granulócitos, plasmatócitos, pró-hemócitos e oenocitóides (Fig. 1). No que se refere à quantidade, todos os tratamentos apresentaram granulócitos e plasmatócitos como os tipos celulares mais comuns.

A azadiractina provocou aumento não significativo na quantidade de granulócitos e plasmatócitos em relação ao controle. Contudo, houve redução significativa do número de pró-hemócitos e oenocitóides comparado ao controle (Tabela 2).

Quando comparado à deltametrina, azadiractina diferenciou apenas no número de adipohemócitos e plasmatócitos. Havendo redução de adipohemócitos com o inseticida sintético, e

aumento de plasmatócitos na hemolinfa de *P. nigrispinus* tratado com deltametrina em relação à azadiractina. Ainda é possível observar um aumento considerável do número de plasmatócitos e, respectiva redução dos outros tipos celulares, quando comparado à hemolinfa dos insetos do grupo controle, apenas não havendo diferença no número de granulócitos do tratamento com deltametrina em relação ao controle (Tabela 2).

A quantidade de pró-hemócitos e oenocitóides terem reduzido na hemolinfa de ninfas de *P. nigrispinus* tratadas com azadiractina corrobora com os efeitos provocados pelo formulado à base de nim (Neemseto[®]) em lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas a 0,5 e 1% (Correia *et al.* 2008).

Os pró-hemócitos possuem esse nome devido sua capacidade de se diferenciar em outros tipos de hemócitos, considerados as células-tronco dos insetos (Brehélin *et al.* 1978, Lavine & Strand 2002). Portanto, a redução desse tipo celular pode ser explicado devido à sua diferenciação em outros tipos celulares, justificando o aumento, apesar de não significativo, de granulócitos e plasmatócitos nos percevejos tratados com azadiractina, e aumento de plasmatócitos nos insetos tratados com deltametrina, células estas com função de reconhecimento de partículas estranhas e envolvidas no processo de fagocitose e detoxificação (Brehélin *et al.* 1978, Ribeiro & Brehélin 2006).

A análise fatorial da atividade da fenoloxidase após 24 h demonstrou não haver diferença entre a forma de extração (hemolinfa e macerado) ($F=0$; $P=0,9528$), e o tempo de reação (20 minutos) ($F=0,26$; $P=0,9995$), porém houve alteração enzimática entre os três tratamentos, com redução significativa para os tratados com inseticidas quando comparado ao controle (Tabela 3). Assim como no intervalo de 24 h, as ninfas provenientes do tratamento com inseticidas após 72 h apresentaram também uma redução da atividade da fenoloxidase em relação ao controle ($F=163,54$; $P<0,0001$), no entanto, também é observada diferença no tempo da reação desta

enzima ($F=7,95$; $P<0,0001$), havendo decaimento mais rápido com os inseticidas, botânico e sintético (Fig. 2).

O declínio da atividade da fenoloxidase constatada nas ninfas do predador *Podisus* tratadas com ambos inseticidas, botânico e sintético, pode ser explicada devido à redução de oenocitóides observada na contagem diferencial de hemócitos destes grupos, uma vez que estas células estão envolvidas neste processo enzimático por conter precursores de fenoloxidase em seu citoplasma (Iwama & Ashida 1986). Ademais, a fenoloxidase é uma enzima envolvida no processo de melanização através da síntese da melanina, catalizando a oxidação de fenóis em quinonas levando à polimerização espontânea para formar melanina insolúvel (Eleftheriano & Revenis 2011). Sendo assim, é provável que a redução da atividade da fenoloxidase provocadas pela azadiractina seja uma das possíveis causas das malformações descritas por Zanuncio *et al.* (2016) em ninfas e adultos de *P. nigrispinus* tratadas com óleo de nim, uma vez que este composto é tido como regulador de crescimento em insetos [Mordue (Luntz) *et al.* 1998].

Os níveis de óxido nítrico das ninfas de *P. nigrispinus* após 24 h de tratamento, no grupo tratado com azadiractina, $6,56 \pm 0,51$ μmol não diferenciou de ambos tratamentos controle, $7,62 \pm 0,46$ μmol , e deltametrina, $5,92 \pm 0,29$ μmol , porém estes dois últimos grupos mostraram diferenças entre si ($F=3,94$; $P=0,0381$). No entanto, durante o intervalo de 72 h, ambos os inseticidas, azadiractina, $3,37 \pm 0,21$ μmol , e deltametrina, $3,32 \pm 0,20$ μmol , provocaram redução dos níveis de óxido nítrico em relação ao controle (água), $4,48 \pm 0,15$ μmol ($F=11,47$; $P=0,0002$) (Fig. 3).

Além das complexas cascatas enzimáticas pela fenoloxidase, a resposta humoral dos insetos é composta por intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (Bogdan *et al.* 2000, Nappi & Vass 2001), como o óxido nítrico, uma pequena molécula sinalizadora que atua nos sistemas nervoso e imunológico de insetos atuando como um mediador, sintetizado pela óxido nítrico

sintase a partir de L-arginina (Davies 2000, Rivero 2006). No sistema imune de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) é reportada sendo produzida no intestino e hemócitos agindo como molécula citotóxica e sinalizadora que desencadeia a produção do peptídeo antimicrobiano dipterina (Nappi *et al.* 2000, Foley & O'Farrell 2003). Assim, a redução de óxido nítrico em *P. nigrispinus* tratados com azadiractina e deltametrina, pode ter relação com a redução de hemócitos, interferindo na resposta humoral deste predador, tornando-o mais suscetíveis às infecções por patógenos e parasitoides.

Após 24 h da aplicação, as ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* tratadas com ambos inseticidas, azadiractina ($496,43 \pm 24,40 \mu\text{g/mL}$) e deltametrina ($353,37 \pm 47,86 \mu\text{g/mL}$) sofreram redução na quantidade lipídio total em relação ao controle ($667,96 \pm 57,37$) ($F=12,05$; $P=0,0005$). Contudo, no intervalo de 72 h, não houve diferença dos níveis de lipídios entre os respectivos tratamentos, azadiractina ($414,28 \pm 42,42 \mu\text{g/mL}$) deltametrina ($469,84 \pm 32,17 \mu\text{g/mL}$) e controle ($454,28 \pm 29,46 \mu\text{g/mL}$) ($F=0,61$; $P=0,5517$) (Fig. 4).

Os níveis de açúcar total em ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus*, no intervalo de 24 h, apresentou diferença entre os três tratamentos, controle ($66,50 \pm 3,68 \mu\text{g/mL}$), com azadiractina ($45,02 \pm 5,77 \mu\text{g/mL}$) e deltametrina ($25,27 \pm 4,73 \mu\text{g/mL}$) ($F= 18,37$; $P<0,0001$). No intervalo de 72 h, os níveis de açúcar nos percevejos tratados com deltametrina ($37,16 \pm 4,31 \mu\text{g/mL}$) mostraram uma redução em relação ao controle ($58,28 \pm 5,82 \mu\text{g/mL}$), porém os níveis de açúcar dos insetos tratados com azadiractina ($43,34 \pm 5,87 \mu\text{g/mL}$), não diferiram de ambos os grupos ($F= 4,06$; $P=0,0302$) (Fig. 5).

A baixa concentração de açúcar em *P. nigrispinus* se deve ao estresse provocado nesses insetos pela azadiractina como sugerido por Silva *et al.* (2016), uma vez que a concentração de açúcares, em especial a trealose, é extremamente dependente das condições ambientais, estado

fisiológico e nutricional do inseto, com sua síntese e degradação sob controle hormonal envolvendo ambos os fatores hiper e hipotrealosêmico na hemolinfa (Thompson 2003).

Não houve diferença entre os níveis de glicogênio após 24 h de aplicação entre os tratamentos com o controle ($18,77 \pm 1,76 \mu\text{g/mL}$), azadiractina ($13,37 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$) e deltametrina ($13,11 \pm 2,24 \mu\text{g/mL}$) ($F=2,18$; $P=0,142$). No intervalo de 72 h, o grupo tratado com azadiractina ($15,45 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$) não mostrou diferença com ambos os tratamentos, controle ($18,93 \pm 1,36 \mu\text{g/mL}$) e deltametrina ($10,09 \pm 1,52 \mu\text{g/mL}$). No entanto, os insetos tratados com o inseticida sintético apresentaram redução dos níveis de glicogênio em relação ao controle ($F=7,93$; $P=0,0020$) (Fig. 6).

As ninfas de *P. nigrispinus* após 24 h de tratamento não mostraram diferença nos níveis de proteínas nos insetos tratados com azadiractina ($19,75 \pm 2,06 \mu\text{g/mL}$) em relação ao controle ($19,60 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$), porém houve redução destes níveis nos insetos tratados com deltametrina ($10,71 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$) ($F=8,91$; $P=0,002$). Já nos insetos com intervalo de 72 h é observada diferença entre os três tratamentos, onde os insetos provenientes do grupo azadiractina ($15,93 \pm 1,49 \mu\text{g/mL}$) apresentam uma redução dos níveis de proteína quando comparado ao controle ($22,45 \pm 1,21 \mu\text{g/mL}$), e aumento do nível proteico no grupo deltametrina ($35,66 \pm 2,27 \mu\text{g/mL}$) em relação a ambos os tratamentos ($F=34,17$; $P<0,0001$) (Fig. 7). Segundo Sharma *et al.* (2011), a redução dos níveis proteicos nas ninfas de *P. nigrispinus* provocada pelo inseticida botânico é devido, provavelmente, à interferência deste produto com os hormônios que regulam a síntese proteica. Portanto, a redução dos níveis de açúcar e proteína nas ninfas de *P. nigrispinus* tratadas com azadiractina após 24h mostram que este inseticida é capaz de modificar o perfil bioquímico deste predador, assim como outros inseticidas botânicos, como reportado por Silva *et al.* (2016) que observaram alterações na quantidade de proteína, lipídios, açúcar e glicogênio de lagartas de *S.*

frugiperda após consumirem folhas de milho tratadas com óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt).

Quanto às alterações no perfil bioquímico de *P. nigrispinus* provocadas pelo inseticida sintético deltametrina, deve estar associado ao fato deste produto, por ser um piretroide, agir de imediato no inseto causando paralisia e o efeito *knock down* (Santos *et al.* 2007), fazendo com que o percevejo fique sem se alimentar durante este período, comprometendo suas reservas. Além disso, há um aumento da exigência energética devido ao estresse provocado pelo inseticida e aumento das enzimas destoxicadoras (Oliveira *et al.* 2005), o que justificaria a redução dos metabólitos avaliados após 24 h de tratamento e continua redução dos níveis de açúcar e glicogênio após 72 h, visto que são fonte de energia imediata (Gillot 2005) e aumento de proteínas.

Medina *et al.* (2004) assume que a azadiractina possui vários modos e sítios de ação, uma vez que este produto pode causar efeitos sobre diversos tecidos e órgãos. No entanto, mesmo este composto não sendo prejudicial a alguns insetos benéficos pode vir a ser tóxico a outros, mostrando a necessidade de testes individuais sobre diferentes espécies.

O Azamax[®], inseticida a base do composto natural azadiractina, apesar de considerado seguro aos inimigos naturais, foi capaz de alterar a dinâmica hemocitária e reduzir níveis da fenoxidase e óxido nítrico de *P. nigrispinus*, afetando sua resposta imune e, conseqüentemente, seu estado nutricional, semelhante ao Decis[®]. Alterações estas que podem interferir de forma direta ou indireta na sobrevivência deste inseto. Diante destes resultados, é confirmada a importância de estudos fisiológicos a fim de elucidar os modos de ação destes compostos em diferentes inimigos naturais, visto que estes possuem hábitos variados e estão sujeitos aos diferentes inseticidas no agroecossistema; e reforça a premissa que a azadiractina, apesar de apresentar uma toxicidade menos aguda e efeitos menos diretos que a deltametrina, deve ser

utilizada com cuidado quando associada ao controle biológico com o percevejo predador *P. nigrispinus*.

Agradecimentos

Agradecemos à Capes pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho. Ao Prof. Manoel G. C. Gondim Júnior, responsável pelo Laboratório de Acarologia (UFRPE), pela disponibilidade de equipamentos que tornaram essa pesquisa possível. E ao Prof. José Wagner da Silva Melo (UFC), pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Literatura Citada

- Agrofit. 2018.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Online.
- Bogdan, C., M. Rollinghoff & A. Diefenbac. 2000.** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 64-76.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brehélin, M., D. Zachary & J.A. Hoffmann. 1978.** A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. *Cell Tiss. Res.* 195: 45-57.
- Correia, A.A., V. Wanderley-Teixeira, Á.A.C. Teixeira, J.V. Oliveira & J.B. Torres. 2008.** Dinâmica hemocitária em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Bol. San. Veg. Plagas* 34: 357-365.
- Davies, S.A. 2000.** Nitric oxide signalling in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1123-1138.
- De Clercq, P., F. Melevede, I. Mesidagh, K. Vandendurpel, J. Mohaghegh & D. Degheele. 1998.** Predation on the tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lep., Noctuidae) by *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* 122: 93-98.
- De Clercq, P., J. Mohaghegh & L. Tirry. 2000.** Effects of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biol. Control* 18: 65-70.

- Eleftherianos, I. & C. Revenis. 2011.** Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J. Innate Immun.* 3: 28-33.
- Falleiros, A.M.F., M.T.S. Bombonato & E.A. Gregório. 2003.** Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 287-294.
- Faraldo, A.C., A. Sanunes, L.H. Faccioli, E.A. Del Bel & E. Lello. 2005.** Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide* 13: 240-246.
- Faraldo, A.C., P.M. Nóbile, S. Daffre, E.A. Gregório & E. Lello. 2006.** Prophenoloxidase activation in blowfly hemolymph after yeast inoculation. In: Resumos. Búzios, Sociedade Brasileira de Biologia Celular.
- Ferreira, J.A.M., J.C. Zanuncio, J.B. Torres & A.J. Molina-Rugama. 2008.** Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) larvae. *Biocontrol Sci. Technol.* 18: 711-719.
- Foley, E. & P.H. O'Farrell. 2003.** Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Develop.* 17:115-25.
- Gillott, C. 2005.** Entomology. Dordrecht, Springer, 834p.
- Green, L.C., K.R. De Luzuriaga, D.A. Wagner, W. Rand, N. Istfan, V.R. Young & S.R. Tannenbaum. 1981.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7764-768.
- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Iwama, R. & M. Ashida. 1986.** Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 16: 547-555.
- Lavine, M.D. & M.R. Strand. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Martinez, S. & H.F. Van Emden. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30: 113-125.
- Medeiros, R.S., F.S. Ramalho, J.E. Serrão & J.C. Zanuncio. 2004.** Estimative of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera:Pentatomidae) development time with non linear models. *Neotrop. Entomol.* 33: 141-148.

- Medina, P., F. Budia, P. Del Estal & E. Viñuela, 2004.** Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *J. Econ. Entomol.* 97:43-50.
- Mordue, A.J., E.D. Morgan & A.J. Nisbet. 2010.** Azadirachtin, a natural product in insect control, p.185-203. In L.I. Gilbert & S.S. Gill (eds) *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. London, Academic Press, 490p.
- Mordue (Luntz), A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 615-632.
- Mordue (Luntz), A.J., M.S.J. Simmonds, S.V. Ley, W.M. Blaney, W. mordue, M. Nasiruddin & A.J. Nisbet. 1998.** Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. *Pestic. Sci.* 54: 277-284.
- Nappi, A.J., E. Vas. 2001.** Cytotoxic reactions associated with insect immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 484: 329-348.
- Nappi, A.J., E. Vass, F. Frey, Y. Carton. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4: 423-430.
- Oliveira, E.E., R.N.C. Guedes, A.S. Corrêa, B.L. Damasceno & C.T. Santos. 2005.** Resistência vs susceptibilidade a piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): Há vencedor? *Neotrop. Entomol.* 34: 981-990.
- Pereira, A.I.A., F.S. Ramalho, C.M. Bandeira, J.B. Malaquias & J.C. Zanuncio. 2009.** Age-dependent fecundity of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) with sublethal doses of gamma-cyhalothrin. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 1157-1166.
- Qi, B., G. Gordon & W. Gimme. 2001.** Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol. Control* 22: 185-190.
- Ribeiro, C. & M. Brehélin. 2006.** Insect haemocytes: what type cell is that? *J. Insect Physiol.* 52: 417-429.
- Rivero, A. 2006.** Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol.* 22: 219-225.
- Russo, J., M. Brehélin & Y. Carton. 2001.** Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47:167-172.

- Santos, M.A.T., M.A. Areas & F.G.R. Reyes. 2007.** Piretróides - uma visão geral. *Alim. Nutr.* 18: 339-349.
- SAS Institute. 2008.** SAS/STAT User's guide, version 9. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529-551.
- Schmidt, O., U. Theopold & M.R. Strand. 2001.** Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *Bioessays* 23, 344-351.
- Schmutterer, H. 1997.** Side-effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. *J. Appl. Entomol.* 121: 121-128.
- Sharma, P., L. Mohan, K.K. Dua & C.N. Srivastava. 2011.** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4: 301-304.
- Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, F.M. Cunha, J.V. Oliveira, K.A. Dutra, D.M.A.F. Navarro & Á.A.C. Teixeira. 2016.** Biochemical parameters of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) treated with citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) and its influence on reproduction. *Acta Histochem.* 118: 347-352.
- Silva, F.A.C. & S.S. Martinez. 2004.** Effect of neem seed oil aqueous solutions on survival and development of the predator *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 1-9.
- Silva-Torres, C.S.A., I.V.A.F. Pontes, J.B. Torres & R. Barros. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 39: 835-838.
- Thompson, S.N. 2003.** Trehalose - The Insect 'Blood' Sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31: 205-28.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* forest in Brazil. *CAB Rev.* 1: 1-18.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & T.V. Zanuncio. 1996.** Produção e uso de percevejos predadores no controle biológico de pragas florestais, p. 41-51. In Workshop sobre Proteção Florestal do Mercosul. Santa Maria, CEFET/UFSM, 80p.
- Van Handel, E. 1985a.** Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1: 302-304.
- Van Handel, E. 1985b.** Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1:299-301.

Zanuncio, J.C., S.A. Mourão, L.C. Martínez, C.F. Wilcken, F.S. Ramalho, A. Plata-Rueda, M.A. Soares & J.E. Serrão. 2016. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Sci. Rep. 6, 1-8.

Tabela 1. Média \pm erro padrão da contagem total de hemócitos de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizados com 2 mL de água destilada, azadiractina 300 mL/ha e deltametrina 200 mL/ha, no intervalo de 24 h após tratamento. Temp.: $25 \pm 0,5$ °C; U.R. 53 ± 5 % e fotofase 12 h.

Tratamento	N ¹	Número de hemócitos/ μ L \pm EP ²
Água	10	$12 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$ a ³
Azadiractina	10	$5,2 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$ b
Deltametrina	10	$6,5 \times 10^3 \pm 0,7 \times 10^3$ b
Estatística F ^P		16,23 ^{<0,0001}

¹Número de repetições por tratamento.

²Erro Padrão.

³Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

Tabela 2. Contagem diferencial de hemócitos de *Podisus nigrispinus* pulverizados com 2 mL de água destilada, azadiractina 300 mL/ha e deltametrina 200 mL/ha, no intervalo de 24 h após tratamento. Temp.: $25 \pm 0,5$ °C, UR: 53 ± 5 % e fotofase 12 h.

Tipos de hemócitos	Tratamento (n=10)	Média \pm EP ¹	Estatística
Adipohemócito	Água	29,0 \pm 5,48 a ²	F=8,58; P=0,0013
	Azadiractina	20,4 \pm 2,86 a	
	Deltametrina	6,4 \pm 1,68 b	
Esferulócito	Água	18,2 \pm 3,44 a	F=5,75; P=0,0083
	Azadiractina	12,1 \pm 1,55 ab	
	Deltametrina	7,4 \pm 1,01 b	
Granulócito	Água	81,1 \pm 8,00 a	F=2,47; P=0,1032
	Azadiractina	108,3 \pm 14,93 a	
	Deltametrina	79,5 \pm 5,52 a	
Plasmatócito	Água	132,3 \pm 8,98 b	F=12,18 P=0,0002
	Azadiractina	145,5 \pm 11,35 b	
	Deltametrina	192,3 \pm 5,91 a	
Pró-hemócito ³	Água	27,1 \pm 5,54 a	$\chi^2=7,99$; GL=2; P=0,0184
	Azadiractina	11,5 \pm 2,75 b	
	Deltametrina	13,0 \pm 2,14 b	
Oenocitóide ³	Água	12,3 \pm 2,11 a	$\chi^2=19,13$; GL=2; P<0,0001
	Azadiractina	2,4 \pm 0,65 b	
	Deltametrina	1,4 \pm 0,30 b	

¹Erro Padrão.

² Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey HSD (P> 0,05).

³Por não apresentarem normalidade, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das médias (P>0,05).

Tabela 3. Atividade da fenoloxidase (OD/min) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizados com 2 mL de água destilada, azadiractina 300 mL/ha e deltametrina 200 mL/ha, no intervalo de 24 h após tratamento. Temp.: $25 \pm 0,5$ °C; U.R. $53 \pm 5\%$ e fotofase 12 h.

Tratamento	N ¹	Intervalo de Tempo	Atividade da fenoloxidase \pm EP ²
Água	5		$0,1592 \pm 0,002$ a ³
Azadiractina	5	24h	$0,1455 \pm 0,002$ b
Deltametrina	5		$0,1257 \pm 0,002$ c
Estatística F ^P			$34,83^{<0,0001}$

¹Número de repetições por tratamento.

²Erro Padrão.

³Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

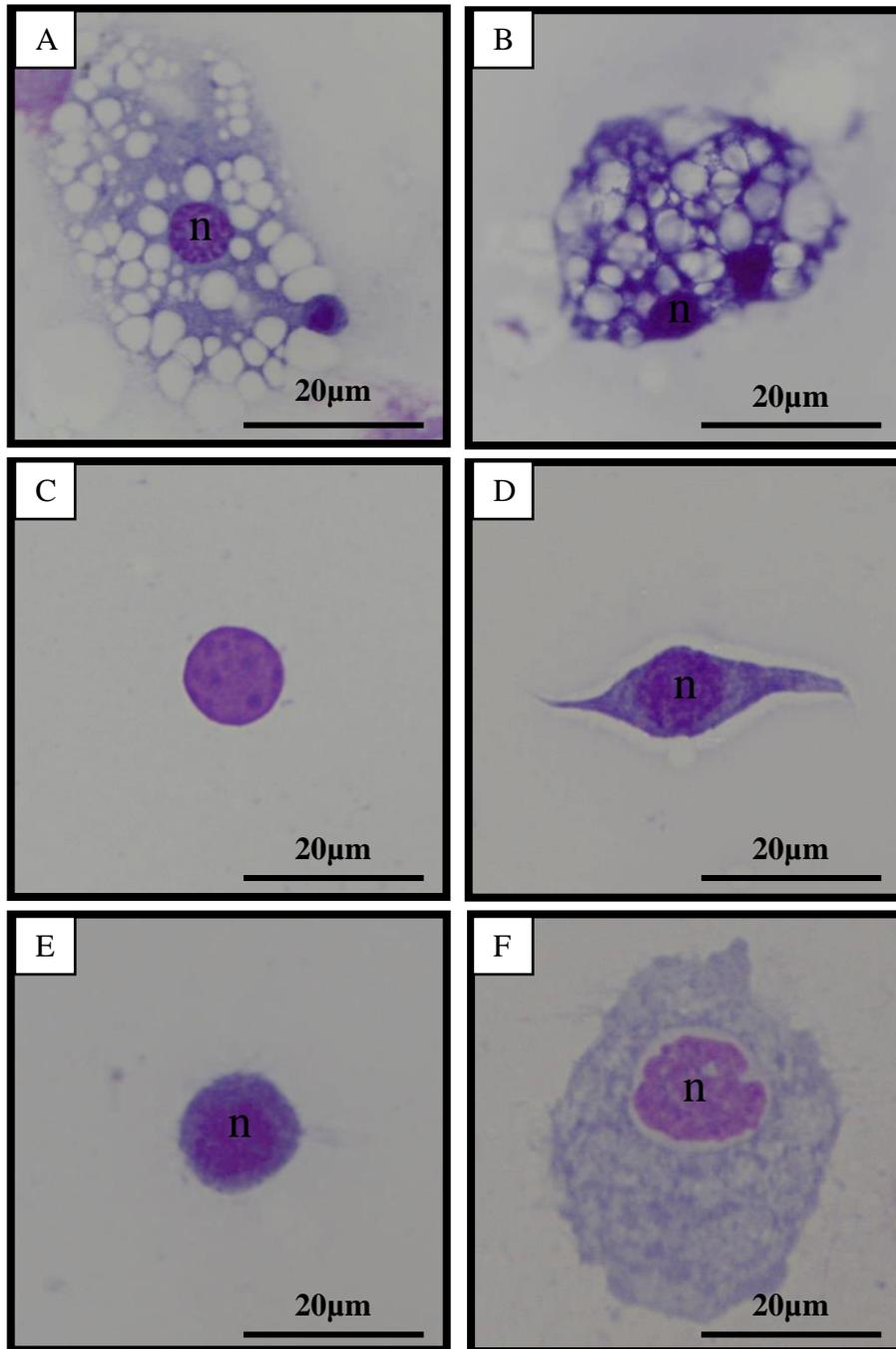


Figura 1. Hemócitos de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* corados com kit Panótico Rápido (Labclin). (A) Adipohemócito. (B) Esferulócito. (C) Granulócito. (D) Plásmatócito. (E) Pro-hemócito. (F) Oenocitóide. n, núcleo.

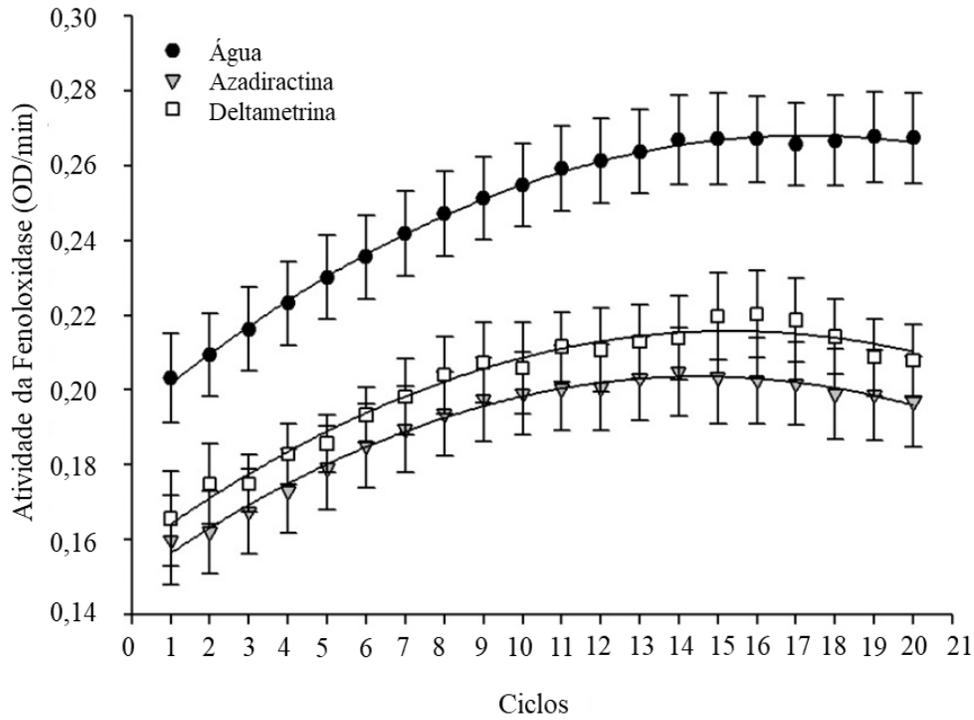


Figura 2. Reação da atividade da fenoloxidase (OD/min) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizadas com 2 mL de água destilada, azadiractina 300 mL/ha e deltametrina 200 mL/ha, no intervalo de 72 h após tratamento.

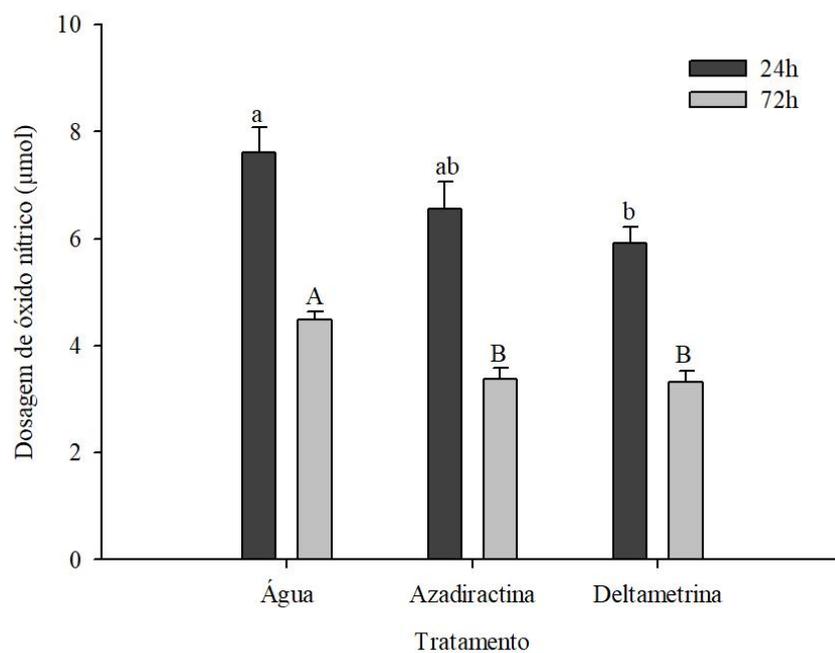


Figura 3. Média (+EP) da dosagem de óxido nítrico (μmol) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizadas com 2 mL de água destilada, azadiractina e deltametrina, no intervalo de 24 e 72 h após aplicação. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

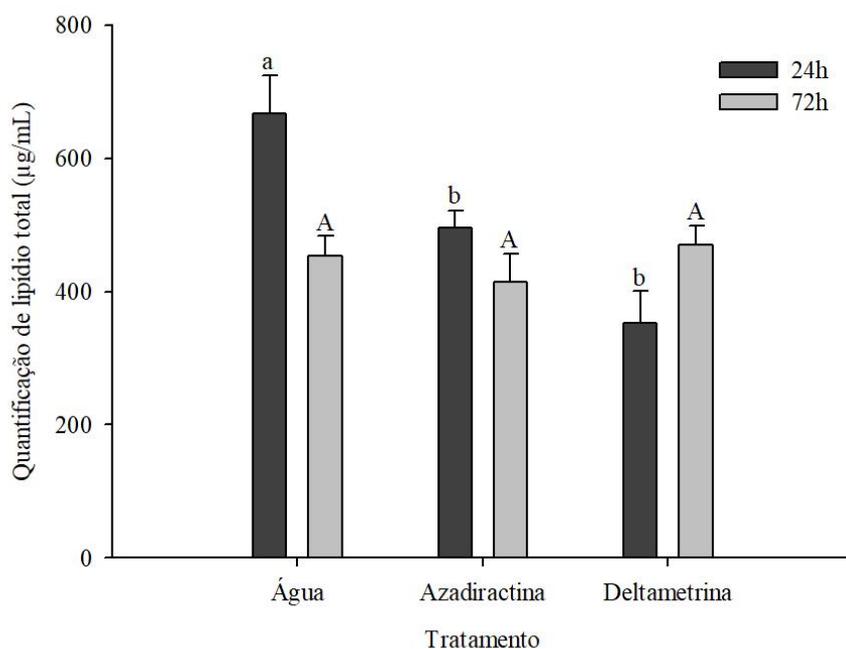


Figura 4. Média (+EP) da quantidade de lipídio total ($\mu\text{g/mL}$) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizadas com 2 mL de água destilada, azadiractina e deltametrina, no intervalo de 24 e 72 h após aplicação. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

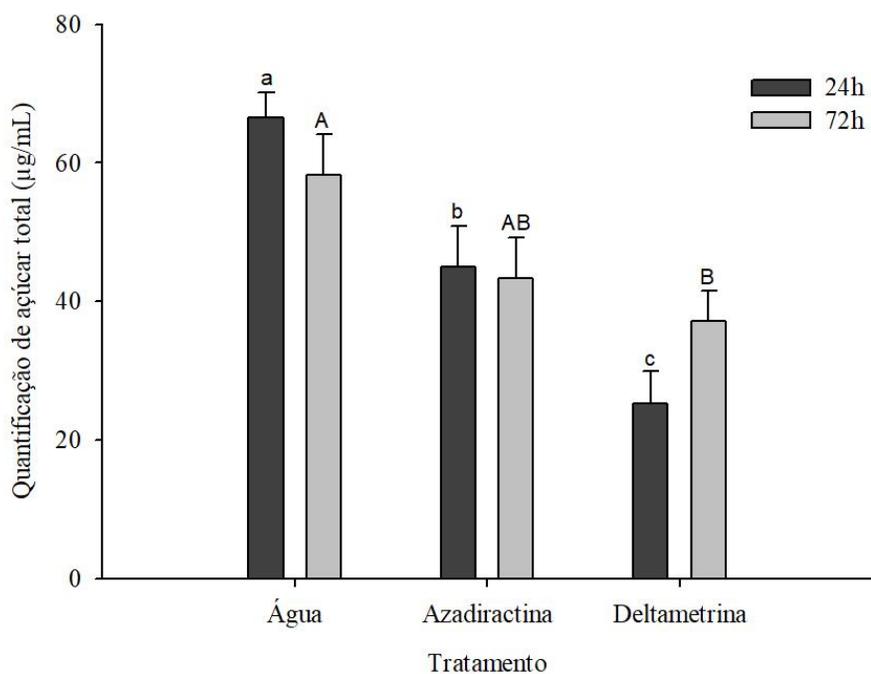


Figura 5. Média (+EP) da quantidade de açúcar total ($\mu\text{g/mL}$) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizadas com 2 mL de água destilada, azadiractina e deltametrina, no intervalo de 24 e 72 h após aplicação. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

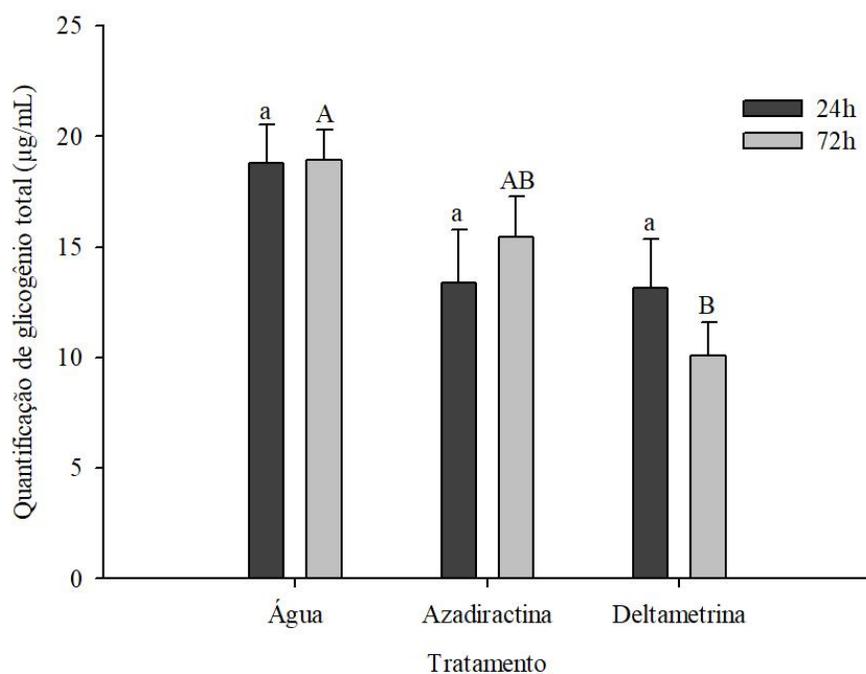


Figura 6. Média (+EP) da quantidade de glicogênio total ($\mu\text{g/mL}$) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizadas com 2 mL de água destilada, azadiractina e deltametrina, no intervalo de 24 e 72 h após aplicação. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

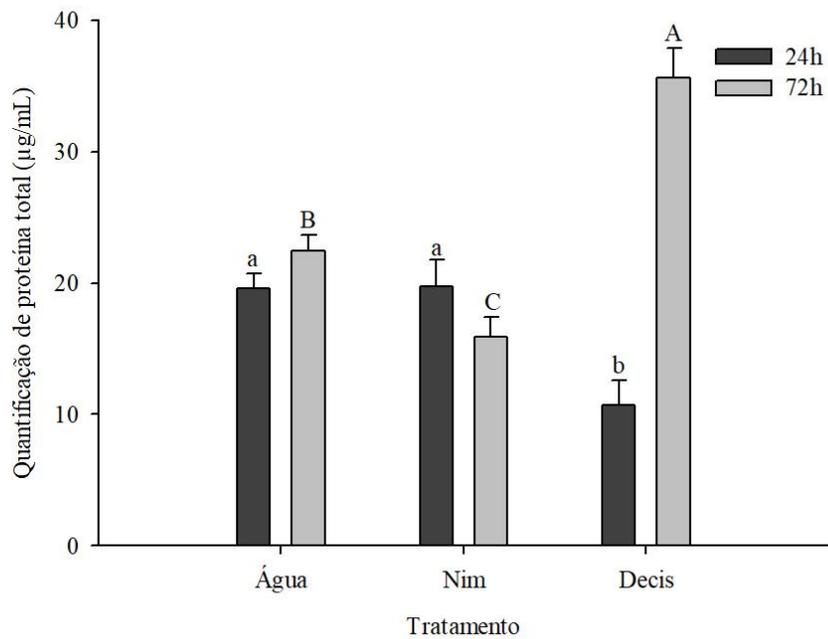


Figura 7. Média (+EP) da quantidade de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) de ninfas de quinto instar de *Podisus nigrispinus* pulverizadas com 2m L de água destilada, azadiractina e deltametrina, no intervalo de 24 e 72 h após aplicação. Colunas com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA AZADIRACTINA ASSOCIADA A
BIOPESTICIDAS EM NINFAS DE *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEMIPTERA:
PENTATOMIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E SEMICAMPO¹

CRISTIANE T.S. SILVA¹, VALÉRIA WANDERLEY-TEIXEIRA^{1,2}, GLAUCILANE S. CRUZ¹, VALESKA
A.Á. BRAGA¹, MARIA C. N. FERREIRA² E ÁLVARO A.C. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia-Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua D. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

¹Silva, C.T.S., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, V.A.A. Braga, M.C.N. Ferreira & Á.A.C. Teixeira. Avaliação da toxicidade da azadiractina associada à biopesticidas em ninfas de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório e semicampo. A ser submetido.

RESUMO - O Manejo Integrado de Pragas (MIP) busca métodos viáveis no controle de insetos-pragas que minimizem os impactos causados pelos inseticidas sintéticos. A azadiractina tem sido reconhecida como um eficiente biopesticida. Entretanto, pesquisas têm demonstrado efeitos negativos deste composto em inimigos naturais. Porém, para um MIP efetivo, os métodos de controle devem agir de maneira sinérgica. Assim, esta pesquisa avaliou o efeito da azadiractina (Azamax[®]) associada a outros biopesticidas (Metarril[®] e Xentari[®]) em ninfas de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Os experimentos constaram de nove tratamentos em suas doses de campo: azadiractina, azadiractina+*Metarhizium*, azadiractina+*Bacillus*, deltametrina, deltametrina+*Metarhizium*, deltametrina+*Bacillus*, *Metarhizium*, *Bacillus*, e controle, apenas com água. Nos bioensaios de laboratório, após aplicação tópica, foi feita a análise de sobrevivência em ninfas pulverizadas e alimentadas com presas tratadas com os inseticidas no intervalo de 24, 48 e 72h. Assim como, a mortalidade (predação) das larvas após 24h. Em casa de vegetação, foi avaliada a taxa de mortalidade das ninfas de *Podisus* após 72h de aplicação dos compostos em plantas de milho com liberação dos predadores. A azadiractina não afetou a sobrevivência nos experimentos de laboratório, mostrando-se menos tóxica que a deltametrina. Apenas nos experimentos em casa de vegetação foi observado aumento da mortalidade pela azadiractina associada com o fungo *Metarhizium*. Dessa forma concluímos que, azadiractina pode ser utilizada concomitante ao controle biológico com o predador *P. nigrispinus*, porém uma seletividade ecológica, como o uso de áreas de refúgios nos locais de aplicação para minimizar os efeitos sobre este inimigo natural, podem ser necessárias.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticida botânico, controle biológico, entomopatógenos, seletividade, predador

EVALUATION OF AZADIRACHTIN TOXICITY ASSOCIATED WITH BIOPESTICIDES IN
Podisus nigrispinus (DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) NYMPHS IN CONDITIONS
OF LABORATORY AND SEMIFIELD

ABSTRACT - Integrated Pest Management (IPM) seeks viable methods to control insect pests that minimize the impacts caused by synthetic insecticides. Azadirachtin has been highlighted as an efficient biopesticide. However, research has shown negative effects of this compound on natural enemies. However, for an effective IPM, control methods should act synergistically. This research evaluated the effect of azadirachtin (Azamax[®]) associated with other biopesticides (Metarril[®] and Xentari[®]) on *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) nymphs. The experiments consisted of nine treatments at their field doses: azadirachtin, azadirachtin + *Metarhizium*, azadirachtin + *Bacillus*, deltamethrin, deltamethrin + *Metarhizium*, deltamethrin + *Bacillus*, *Metarhizium*, *Bacillus*, and control, only with water. In laboratory bioassays, after topical application, survival analysis was performed on spray nymphs fed with prey treated with insecticides in the range of 24, 48 and 72 hours. As well as, the mortality (predation) of the larvae after 24h. In a greenhouse, the mortality rate of *Podisus* nymphs was evaluated after 72 hours of application of the compounds in maize plants with release of predators. Azadirachtin did not affect survival in laboratory experiments, being less toxic than deltamethrin. Only in the greenhouse experiments was observed an increase in mortality from azadirachtin associated with the *Metarhizium* fungus. Thus, azadirachtin can be used concomitantly with biological control with the predator *P. nigrispinus*, but an ecological selectivity, such as the use of refuge areas at the sites of application to minimize the effects on this natural enemy, may be necessary.

KEY WORDS: Botanical insecticide, biological control, entomopathogens, selectivity, predator

Introdução

Devido às preocupações dos possíveis danos ambientais e ecológicos decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos e às ampliações de cultivos orgânicos, juntamente com as recentes exigências de consumidores que buscam uma produção sustentável livre de resíduos agroquímicos, alternativas viáveis têm sido buscadas para a substituição ou redução do uso de produtos sintéticos, impulsionando assim o uso de biopesticidas (Zanuncio *et al.* 1994, Isman 2006, Isman 2008, Regnault-Roger *et al.* 2012).

Os inseticidas botânicos, derivados de plantas, são muitas vezes considerados promissores, visto que possuem como características o adequado controle de pragas alvo, a especificidade, a rápida degradação e baixa toxicidade a humanos e mamíferos (Senthil-Nathan 2013).

Atualmente, a azadiractina, composto secundário produzido pelo nim (*Azadirachta indica* A. Juss), é um complexo limonoide tetranortriterpenóide considerado um dos inseticidas naturais mais importantes no mundo, reconhecido por sua ação como deterrente alimentar e toxicidade em insetos, com grande sucesso no controle de pragas em zonas tropicais e temperadas, e de uso classificado como seguro para os vertebrados [Schmutterer 1990, Mordue (Luntz) & Nisbet 2000, Isman 2006]. Contudo, alguns trabalhos tem questionado sua seletividade a inimigos naturais (Qi *et al.* 2001, Ahmad *et al.* 2003, Scudeler *et al.* 2014, Campos *et al.* 2014), sendo necessário avaliar a seletividade deste composto para que possa ser empregado de forma eficiente no manejo de pragas sem que interfira negativamente organismos não alvos.

Os sistemas agrícolas das regiões tropicais apresentam uma vasta diversidade de organismos que podem ser utilizados no controle biológico, como parasitoides, predadores e entomopatógenos (Ramalho & Wanderley 1996). Em meio a esta riqueza, o percevejo predador, *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), que foi reportado predando larvas de coleópteras e

lepidópteras, tem ganhado destaque devido ao seu potencial no controle de pragas de culturas, como, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Ferreira *et al.* 2008), *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae) (Pereira *et al.* 2009), *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) (De Clercq *et al.* 1998, De Clercq *et al.* 2000), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (Silva-Torres *et al.* 2010), entre outras.

Como dito anteriormente, além dos insetos entomófagos, outros agentes de controle biológico são utilizados e encontrados em diversos ecossistemas, merecendo destaque os entomopatógenos, composto por fungos, bactérias e vírus (Vega & Kaya 2012). Nos agroecossistemas, toda essa gama de inimigos naturais pode ocorrer simultaneamente atacando diferentes ou o mesmo inseto alvo (França *et al.* 2006). Contudo, ações inadequadas na condução dos cultivos durante o controle de pragas e doenças, sobretudo na monocultura, podem ocasionar prejuízo na ação benéfica dos inimigos naturais (Bueno *et al.* 2017).

França *et al.* (2006) preconizaram a necessidade do estudo das interações entre os diferentes agentes de controle biológico, pois a relação entre eles pode ocorrer diretamente durante as aplicações, ou mesmo indiretamente, ao entrarem em contato com plantas tratadas ou ao se alimentarem de presas infectadas pelos entomopatógenos. Diante dessa premissa, este trabalho tentou responder os seguintes questionamentos: I. a azadiractina seria tóxica às ninfas do percevejo *P. nigrispinus*? II. A azadiractina poderia ser capaz de prejudicar a sobrevivência deste inimigo natural ao interagir com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae)? Um vez que estes entomopatógenos são comumente encontrados no agroecossistema e utilizados no controle de pragas.

Material e Métodos

Insetos. As criações de *P. nigrispinus* e *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae), foram provenientes do setor de Entomologia da Embrapa Algodão (Campina Grande-PB, Brasil) e então estabelecidas no laboratório de Fisiologia de insetos (LAFI), do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE (Recife-PE, Brasil). Os predadores, *P. nigrispinus*, foram criados de acordo com a metodologia estabelecida por Torres (1996) e mantidos em câmaras climatizadas do tipo D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12:12 h (L:E) enquanto eram alimentados com larvas e pupas do besouro *T. molitor*. A criação de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidade) foi mantida em dieta artificial segundo Busato *et al.* (2006), sob as mesmas condições ambientais que o predador.

Inseticidas. Foram utilizados nos bioensaios os inseticidas em suas doses recomendadas de campo com formulações registrados segundo o Agrofit (2018): Azadiractina 300 mL/ha (Azamax[®] EC, 12 g i.a./L), conídios de fungos *M. anisoplae* (Mestch.) Sorok, 500 g/ha (Metarril[®] WP E9, 50g i.a./kg), *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 500g/ha (XenTari[®] WG, 540 g i.a./Kg), e deltametrina 200mL/ha (Decis[®] 25EC, 25 g i.a./L).

Bioensaios. Os experimentos constaram de duas etapas, em laboratório, onde foi feita a análise de sobrevivência de ninfas de quinto instar pulverizadas e alimentadas com larvas pulverizadas com os inseticidas; e em casa de vegetação, onde foi avaliada a mortalidade desses após efeito residual em plantas tratadas com os inseticidas. Foram utilizados 9 tratamentos no total:

- I- Azadiractina
- II- Azadiractina + *M. anisoplae*
- III- Azadiractina + *B. thuringiensis*
- IV- Deltametrina
- V- Deltametrina + *M. anisoplae*

- VI- Deltametrina + *B. thuringiensis*
- VII- *M. anisoplae*
- VIII- *B. thuringiensis*
- IX- Água

Análise de Sobrevivência de Ninfas de Podisus nigrispinus Após Contato Tópico em Laboratório.

Grupos de cinco ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* foram alocados em placas de Petri e pulverizados com 2 mL do inseticida em torre de Potter, localizada no laboratório de Acarologia do Departamento de Agronomia/UFRPE. No caso dos tratamentos com mais de um inseticida, primeiro foi aplicado o inseticida sintético ou botânico e, após secagem em temperatura ambiente, empregada à calda com o patógeno. Após a pulverização, os insetos foram individualizados em tubos de fundo chato de vidro de aproximadamente 40 mL e tampados com plástico filme PVC, onde nestes eram disponibilizados um pequeno chumaço de algodão (aproximadamente 2cm de diâmetro) hidratado com água destilada e uma larva/pupa de *T. molitor*. Foram avaliados os números de mortos no período de 24, 48 e 72 h após a exposição. Durante os experimentos, todos os dias foram disponibilizados novos alimento e água, com exceção, nas primeiras 24 h, para os tratamentos em que foi aplicado o deltametrina, uma vez que os insetos mantiveram-se em efeito *knock-down*. Para cada tratamento foram utilizados 30 insetos, e cada um constou como uma repetição.

Análise de Sobrevivência de Ninfas de Podisus nigrispinus Após Exposição à Presa Pulverizada em Laboratório.

Grupos de cinco larvas de *S. frugiperda* de quarto instar foram pulverizadas com 2 mL dos inseticida em torre de Potter. Após secas em temperatura ambiente, estas larvas foram fornecidas às ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus*, na proporção de 1:1 de presa/predador em tubos de vidro cilíndricos vedados com plástico filme. Após 24h foi avaliada a quantidade de larvas que foram encontradas mortas e sugadas de cada tratamento, bem como avaliado o número

de *P. nigrispinus* sobreviventes. Destes, foram separados aleatoriamente 10 ninfas de cada tratamento, exceto o grupo em que as larvas foram tratadas apenas com azadiractina, o qual somente foram encontradas cinco larvas predadas. Estas ninfas então foram novamente alimentadas com *T. molitor* e avaliada a mortalidade após 72 h. Inicialmente, cada grupo constou de 30 larvas de *S. frugiperda* e 30 ninfas de *P. nigrispinus*, em que cada ninfa constou como uma repetição.

Avaliação da Mortalidade de Podisus nigrispinus em Condições de Semicampo. Sementes de milho (*Zea mays* L.) híbrido duplo AG105 foram plantadas na casa de vegetação da área de fitossanidade, Departamento de Agronomia/UFRPE durante o mês de Agosto de 2018. Foram semeadas três plantas em copos descartáveis de 500 mL com solo enriquecido com húmus. Após 21 dias, estas foram desbastadas, deixando apenas uma planta por copo e aplicados os tratamentos. Utilizando pulverizadores manuais de 500 mL, os inseticidas foram aplicados por vez, até o ponto de gotejamento e então esperados secar em temperatura ambiente. No caso de tratamentos com mais de um inseticida, aplicou-se primeiramente o inseticida sintético ou botânico, esperando secar para haver aplicação do patógeno em seguida.

No interior de cada cartucho de milho foi inserida uma larva de *S. frugiperda* de quarto instar. Em seguida, as plantas foram ensacadas com organza e dentro destas foram dispostas três ninfas de quinto instar do predador. Após 72 h, foram avaliadas a mortalidade das lagartas e dos predadores. Cada tratamento constou de 20 plantas, e cada planta foi considerada como uma repetição.

Análise Estatística. Devido aos dados não apresentarem normalidade, foram realizados testes não paramétricos nas análises.

A análise de sobrevivência das ninfas de quinto instar de *P. nigrispinus* pulverizadas e alimentadas com presas tratadas foi realizada através do teste não paramétrico de Mantel-

Haenszel, na qual os dados foram comparados ao controle pelo método de Bonferroni, com o nível de significância de 5%, através do programa estatístico R 3.5 (R Core Team 2018).

Os dados das mortalidades das larvas de *S. frugiperda* dos bioensaios em laboratório e casa de vegetação, por não apresentarem normalidade, foram submetidos ao teste exato de Fisher em que todos os tratamentos foram comparados par a par, com o nível de significância de 5%, através do programa estatístico R 3.5 (R Core Team 2018).

Quanto à sobrevivência das ninfas de *P. nigrispinus* do bioensaio em casa de vegetação, foram contabilizados mortos, sobreviventes e desaparecidos (quando não eram encontrados restos/vestígios). Foi obtida a taxa (%) da mortalidade por planta entre mortos e vivos, e então submetida ao teste de Kruskal-Wallis, através do programa estatístico SAS (SAS Institute 2008). Para a confecção dos gráficos, foi utilizado o programa Sigmaplot 12.0 (Systat Software Inc.).

Resultados

Análise de Sobrevivência de Ninfas de *Podisus nigrispinus* Após Contato Tópico em Laboratório. A análise de sobrevivência das ninfas pulverizadas em torre de Potter mostrou haver diferença entre os tratamentos (teste de Mantel-Haenszel: $\chi^2 = 32$; GL = 8; $P = 9 \times 10^{-5}$). Os tratamentos com biopesticidas, azadiractina e/ou *M. anisoplae* e *B. thuringiensis*, não mostraram diferença significativa do controle. No entanto, entre os tratamentos com deltametrina, apenas deltametrina + *B. thuringiensis* apresentou uma não diferença marginal, uma vez que o valor de p foi muito próximo de 0,05 ($P = 0,0827$), já deltametrina ($P = 0,0067$) e deltametrina + *M. anisoplae* ($P = 0,0144$) apresentaram diferença significativa, ambos com uma taxa de mortalidade de 60% em relação ao controle com apenas 30% após 72 h (Fig. 1).

Análise de Sobrevivência de Ninfas de *Podisus nigrispinus* Após Exposição à Presa Pulverizada em Laboratório. A análise de sobrevivência das ninfas alimentadas com larvas de

S. frugiperda pulverizadas não mostrou diferença significativa entre os tratamentos com inseticidas em relação ao controle (teste de Mantel-Haenszel: $\chi^2 = 10,7$; GL = 8; P = 0,2).

Quanto ao número de larvas que foram consumidas/mortas após 24 h, observamos que o grupo tratado apenas com azadiractina foi o único a apresentar diferença significativa a outros tratamentos como azadiractina + *M. anisoplae* (P = 0,007), deltametrina (P = 0,002), deltametrina + *M. anisoplae* e deltametrina + *B. thuringiensis* (P < 0,001, para ambos) e *B. thuringiensis* (P = 0,029), e apenas uma não diferença marginal com azadiractina + *B. thuringiensis*, *M. anisoplae* e controle (P = 0,052). Os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 1, Fig. 2). Contudo, é interessante observar que os tratamentos com deltametrina foi onde ocorreram maior mortalidade das larvas, todos acima de 50%, seguido pelo tratamento com a azadiractina associada ao fungo *M. anisoplae*.

Avaliação da Mortalidade de *Podisus nigrispinus* em Condições de Semicampo. Houve diferença significativa na taxa de mortalidade de ninfas de *Podisus* entre os tratamentos ($\chi^2 = 16,44$; GL = 8; P = 0,0365). Apenas azadiractina associada ao fungo (P = 0,0448) e deltametrina (P = 0,0374) ocasionaram uma maior taxa de mortalidade significativa que o controle. No entanto, o tratamento apenas com azadiractina foi o que obteve menor mortalidade, e apresentou diferença significativa aos tratamentos com inseticida sintético, deltametrina, deltametrina + *M. anisoplae* e deltametrina + *B. thuringiensis*, e aos tratamentos em que se encontrava associada aos patógenos, azadiractina + *M. anisoplae* e azadiractina + *B. thuringiensis* (Fig. 3).

Quanto à mortalidade das larvas, não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Fisher (larvas não encontradas não foram utilizados nos testes estatísticos) (Tabela 2, Fig. 4).

Discussão

A azadiractina em dose de campo recomendada para *S. frugiperda* (300mL/ha), não foi capaz de afetar a sobrevivência das ninfas de quinto instar do predador *P. nigrispinus* após 72 h de exposição nos bioensaios de laboratório. Estes resultados diferem do encontrado por Zanuncio *et al.* (2016), onde verificaram uma redução na sobrevivência deste predador após aplicação tópica do óleo de nim (Bioneem) em concentrações acima de 25%, provenientes de uma solução estoque 100g/L de inseticida diluída. Como o Bioneem (25g/L), produto formulado utilizado nos experimentos, possui pouco mais que o dobro do ingrediente ativo azadiractina que o Azamax[®], confirma o que estes autores propuseram sobre a suscetibilidade dos Hemipteras variarem de acordo com a exposição em diferentes concentrações de óleo de nim.

Quanto à alta letalidade provocada pelo deltametrina após contato tópico em laboratório, é importante lembrar que, diferente do nim que é reconhecido por seu modo de ação estar relacionado com uma maior contaminação por ingestão (Martinez & Van Emden 2001), piretroides possuem efeitos tópico e agudo, causando paralisia (Santos *et al.* 2007), fazendo com que o percevejo fique sem se alimentar durante este período e assim suas reservas energéticas sejam comprometidas (dados não publicados).

O menor número de larvas consumidas (5) quando pulverizadas com azadiractina, apesar de não apresentar diferença significativa com o controle, é possível que seja devido ao efeito repelente já conhecido na literatura deste composto [Mordue (Luntz) & Nisbet 2000]. Quanto aos patógenos, *M. anisoplae* e *B. thuringiensis*, estes não foram capazes de prejudicar a predação das larvas pulverizadas e, possivelmente, ao serem aplicados após a azadiractina, tenha minimizado o efeito repelente deste composto. Já o aumento de larvas consumidas após aplicação da deltametrina, se deve à redução da motilidade e consequente perda da resistência à predação, como relatado por Campos *et al.* (2014).

As ninfas alimentadas com larvas de *S. frugiperda* pulverizadas com os inseticidas não sofreram mortalidade significativa nos bioensaios de laboratório. Resultados semelhantes foram encontrados por França *et al.* (2006), onde ninfas de *P. nigrispinus* alimentadas com larvas de *A. argillacea* tratadas com *M. anisopliae* na concentração de 10^7 conídios ml^{-1} não apresentaram mortalidade. Bem como por Campos *et al.* (2014), em que o consumo de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas tratadas com as concentrações de óleo de nim (0,077, 0,359 e 0,599%) e deltametrina (0,100%) não influenciou na mortalidade ninfal de *P. nigrispinus*.

Semelhante aos bioensaios no laboratório, a azadiractina se mostrou seletiva às ninfas de quinto ínstar de *P. nigrispinus* em casa de vegetação, diferente do que foi observado com o inseticida deltametrina, o qual apresentou toxicidade ao predador por elevar a mortalidade deste em relação ao controle. Segundo de Castro *et al.* (2013), a alta toxicidade de deltametrina é devido ao espectro de ação desse inseticida ser amplo, apresentando menor seletividade para espécies não-alvo. Contudo, quando a azadiractina foi aplicada associada ao fungo a taxa de mortalidade de *P. nigrispinus* se comportou semelhante à do inseticida sintético.

A azadiractina, como xenobiótico, em dose de campo, é capaz de interferir na resposta imune de ninfas de *P. nigrispinus*, reduzindo óxido nítrico e conseqüentemente o número de hemócitos, tornando este predador mais suscetível à ação de patógenos (dados não publicados), como observado com fungo *M. anisoplae*.

Segundo França *et al.* (2006), nos agroecossistemas os fungos chegam a ocasionar naturalmente cerca de 80% das patologias nos insetos, uma vez que estes parasitos podem entrar em contato com seu hospedeiro seja por contato direto com os conídios dos fungos no momento da aplicação ou pelos resíduos destes depositados sobre as folhas. Estes mesmos autores verificaram, através de diferentes vias de aplicação (tópica, caminhamento em folhas tratadas e predação de presas infectadas), que o tratamento tópico apresentou maior taxa de virulência com

os fungos *M. anisoplae* e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em *P. nigrispinus*, sendo as ninfas do predador mais suscetíveis que adultos. O que reforça a hipótese que a azadiractina torna o predador mais vulnerável à ação do fungo.

No que diz respeito à bactéria *B. thuringiensis*, diferente do fungo, não apresentou toxicidade às ninfas de *P. nigrispinus*. Vale salientar que, percevejos apresentam o aparelho bucal do tipo sugador, que lhe proporcionam uma digestão iniciada extra-oralmente, onde proteases presentes na saliva são secretadas no alimento. Após ingerir os nutrientes pré-digeridos, eles são completamente digeridos por proteases no intestino e absorvidos (Zhu *et al.* 2003, Schünemann *et al.* 2014).

B. thuringiensis é uma bactéria conhecida por formar durante a esporulação corpos de inclusão parasporal (cristal) formados por proteínas Cry, às quais pertencem à classe de δ -endotoxina e possuem propriedades tóxicas aos insetos após a ingestão (Höfte & Whiteley 1989, Glare & O'Callaghan 2000). Como o Xentari[®] é um produto com método de aplicação tópica (pulverização), as bactérias acabam não prejudicando o predador devido ao seu hábito alimentar, que suga o conteúdo da presa e plantas e inicia a digestão extracorpórea.

A azadiractina (Azamax[®]) não apresentou em nossos resultados uma toxicidade aguda às ninfas de *P. nigrispinus*. Contudo, muitos dos seus efeitos visíveis na literatura, como repelência, inibição de desenvolvimento e ecdise, retardo no desenvolvimento, redução da fertilidade e fecundidade, alterações comportamentais e fisiológicas, estão relacionados à uma toxicidade crônica. Sendo a extensão dos efeitos e seu tempo de reação proporcional à dose utilizada e o tempo de exposição (Martinez 2002, El-Wakeil 2013).

De acordo com Bacci *et al.* (2009) para que ocorra o sucesso de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) se faz necessário o emprego de produtos fitossanitários seletivos aos seus inimigos naturais. A seletividade dos inseticidas ocorre através de métodos fisiológicos, que

consiste no uso de inseticidas que sejam menos tóxicos aos inimigos naturais que às pragas, e/ou ecológicos, buscando minimizar a exposição do inimigo natural ao uso de inseticidas (Ripper *et al.* 1951, O'Brien 1960). Sendo assim, a azadiractina mostrou uma seletividade fisiológica às ninfas do predador *P. nigrispinus*, mesmo quando aplicada juntamente com *B. thuringiensis* (Xentari[®]) em dose de campo em bioensaios de laboratório e casa de vegetação, no entanto quando aplicada juntamente com o *M. anisoplae* (Metarril[®]) em casa de vegetação foi tão tóxico quanto o inseticida sintético deltametrina. Concluímos assim que, a azadiractina (Azamax[®]) pode ser utilizada concomitante ao controle biológico com o predador *P. nigrispinus*, porém uma seletividade ecológica, como o uso de áreas de refúgios nos locais de aplicação para minimizar os efeitos sobre este inimigo natural, podem ser necessárias.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Ao Prof. Manoel G. C. Gondim Júnior (UFRPE), responsável pelo Laboratório de Acarologia, pela disponibilidade de equipamentos que tornaram essa pesquisa possível. E ao Dr. Ronald R. de Moura (UFPE), pelo suporte nas análises estatísticas.

Literatura Citada

- Ahmad, M., H.R., Obiewatsch & T. Basedow. 2003.** Effects of neem-treated aphids as food/hosts on their predators and parasitoids. *J. Appl. Entomol.* 127: 458-464.
- Agrofit. 2018.** Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Online.

- Bacci, L., M.C. Picanço, É.M. da Silva, J.C. Martins, M. Chediak & M.E. Sena. 2009.** Seletividade fisiológica de inseticidas aos inimigos naturais de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em brássicas. *Ciênc. Agrotec.* 33: 2045-2051.
- Bueno, A.F., G.A. Carvalho, A.C. Santos, D.R. Soza-Gómez & D. M. Silva. 2017.** Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. *Ciênc. Rural* 47: 1-10.
- Busato, G.R., M.S. Garcia, A. E. Loeck, M. Zart, A.M. Nunes, O. Bernardi, F. S. Andersson. 2006.** Adequação de uma dieta artificial para os biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bragantia* 65: 317-323.
- Campos, A.P., A.L. Boiça-Junior & Z.A. Ribeiro. 2014.** Indirect effect of neem oil on *Podisus nigrispinus* (Hemiptera, Pentatomidae): biology and predatory capacity. *Rev. Ceres* 61: 652-659.
- Castro, A.A., A.S. Corrêa, J.C. Legaspi, R.N.C. Guedes, J.E.Serrão & J.C.Zanuncio. 2013.** Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 93: 1043-1050.
- De Clercq, P., F. Melevede, I. Mesidagh, K. Vandendurpel, J. Mohaghegh, D. Degheele. 1998.** Predation on the tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lep., Noctuidae) by *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* 122: 93-98.
- De Clercq, P., J. Mohaghegh & L. Tirry. 2000.** Effects of host plant on the functional response of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biol. Control* 18: 65-70.
- El-Wakeil, N.E. 2013.** Botanical Pesticides and Their Mode of Action. *Gesunde Pflanz.* 65:125-149.
- Ferreira, J.A.M., J.C. Zanuncio, J.B. Torres & A.J. Molina-Rugama. 2008.** Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) larvae. *Biocontrol Sci. Techn.* 18: 711-719.
- França, I.W.B., E.J. Marques, J.B. Torres & J.V. Oliveira. 2006.** Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 35: 349-356.
- Glare, T.R. & M. O’Callaghan. 2000.** *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 350p.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

- Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Isman, M.B. 2008.** Perspective Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag. Sci.* 64: 8-11.
- Martinez, S. & H.F. Van Emden. 2001.** Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30: 113-125.
- Martinez, S.S. 2002.** O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, Instituto Agronômico do Paraná, 142p.
- Mordue, A.J.L. & A.J. Nisbet. 2000.** Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 615–632.
- O’Brien, R.D. 1960.** Toxic phosphorus esters. New York: Academic, 434p.
- Pereira, A.I.A., F.S. Ramalho, C.M. Bandeira, J.B. Malaquias & J.C. Zanuncio. 2009.** Age-dependent fecundity of *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera, Pentatomidae) with sublethal doses of gamma-cyhalothrin. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 1157-1166.
- Qi, B., G. Gordon & W. Gimme. 2001.** Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol. Control* 22: 185–190.
- R Core Team. 2018.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- Ramalho, F.S. & P.A. Wanderley. 1996.** Ecology and management of cotton boll weevil in South American cotton. *Am. Entomol.* 42: 41-47.
- Regnault-Roger, C., C. Vincent & J.T. Arnason. 2012.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu. Rev. Entomol.* 57: 405- 424.
- Ripper, W. E., R.M. Greenslade & G.S. Hartley. 1951.** Selective insecticides and biological control. *J. Econ. Entomol.* 44: 448-459.
- Santos, M.A.T., M.A. Areas & F.G.R. Reyes. 2007.** Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição* 18: 339-349.
- SAS Institute. 2008.** SAS/STAT User’s guide, version 9. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schmutterer, H. 1990.** Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 271-297.

- Schünemann, R., N. Knaak & L.M. Fiuza. 2014.** Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. *ISRN Microbiol.* 2014: 1-12.
- Scudeler, E.L., C.R. Padovani. & D.C. Santos. 2014.** Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on the replacement of the midgut epithelium in the lacewing *Ceraeochrysa claveri* during larval-pupal metamorphosis. *Acta Histochem.* 116:771-780.
- Senthil-Nathan, S. 2013.** Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Front. Physiol.* 4: 1-17
- Silva-Torres, C.S.A., I.V.A.F. Pontes, J.B. Torres & R. Barros. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 39: 835-838.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & T.V. Zanuncio. 1996.** Produção e uso de percevejos predadores no controle biológico de pragas florestais, p. 41-51. In Workshop sobre Proteção Florestal do Mercosul. Santa Maria, CEFET/UFSM, 80p.
- Vega, F.E., & H.K. Kaya. 2012.** *Insect Pathology.* 2nd. ed. San Diego: Academic Press, 490p.
- Zanuncio, J.C., J.B. Alves, T.V. Zanuncio & J.F. Garcia. 1994.** Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecol. Manag.* 65: 65-73.
- Zanuncio, J.C., S.A. Mourão, L.C. Martínez, C.F. Wilcken, F.S. Ramalho, A. Plata-Rueda, M.A. Soares & J.E. Serrão. 2016.** Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Sci. Rep.* 6, 1-8.
- Zhu, Y.C., F.R. Zeng & B. Oppert. 2003.** Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 889-899.

Tabela 1. Valores de *P* determinados pelo teste exato de Fisher de larvas de *Spodoptera frugiperda* mortas ao serem fornecidas para predação de *Podisus nigrispinus* após 24 h de aplicação de inseticidas em torre de Potter.

Tratamentos comparados par a par	Valor de <i>P</i> ¹
Azadiractina vs Azadiractina + <i>M. anisoplae</i>	0,007
Azadiractina vs Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i>	0,052
Azadiractina vs Deltametrina	0,002
Azadiractina vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	0,001
Azadiractina vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	0,001
Azadiractina vs <i>M. anisoplae</i>	0,052
Azadiractina vs <i>B. thuringiensis</i>	0,029
Azadiractina vs Controle	0,052
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i>	0,604
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina	0,617
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	0,435
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	0,604
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>M. anisoplae</i>	0,604
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	0,617
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Controle	0,604
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Deltametrina	0,301
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	0,120
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	0,196
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>M. anisoplae</i>	1,000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Controle	1,000
Deltametrina vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	0,792
Deltametrina vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	1,000
Deltametrina vs <i>M. anisoplae</i>	0,301
Deltametrina vs <i>B. thuringiensis</i>	0,439
Deltametrina vs Controle	0,301
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	1,000
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>M. anisoplae</i>	0,120
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	0,195
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs Controle	0,120
Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>M. anisoplae</i>	0,196
Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	0,301
Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i> vs Controle	0,196
<i>M. anisoplae</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,000
<i>M. anisoplae</i> vs Controle	1,000
<i>B. thuringiensis</i> vs Controle	1,000

¹Tratamentos não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$)

Tabela 2. Valores de p determinados pelo teste exato de Fisher de larvas de *Spodoptera frugiperda* encontradas mortas em plantas tratadas com inseticidas após 72 h, em casa de vegetação.

Tratamentos comparados par a par	Valor de P^1
Azadiractina vs Azadiractina + <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina vs Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina vs Deltametrina	0,6265
Azadiractina vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina vs <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina vs <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina vs Controle	1,0000
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina	0,6204
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina + <i>M. anisoplae</i> vs Controle	1,0000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Deltametrina	0,6204
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Azadiractina + <i>B. thuringiensis</i> vs Controle	1,0000
Deltametrina vs Deltametrina + <i>M. anisoplae</i>	0,6134
Deltametrina vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	0,6204
Deltametrina vs <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Deltametrina vs <i>B. thuringiensis</i>	0,7975
Deltametrina vs Controle	0,7891
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Deltametrina + <i>M. anisoplae</i> vs Controle	1,0000
Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>M. anisoplae</i>	1,0000
Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
Deltametrina + <i>B. thuringiensis</i> vs Controle	1,0000
<i>M. anisoplae</i> vs <i>B. thuringiensis</i>	1,0000
<i>M. anisoplae</i> vs Controle	1,0000
<i>B. thuringiensis</i> vs Controle	1,0000

¹Tratamentos não diferem pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$)

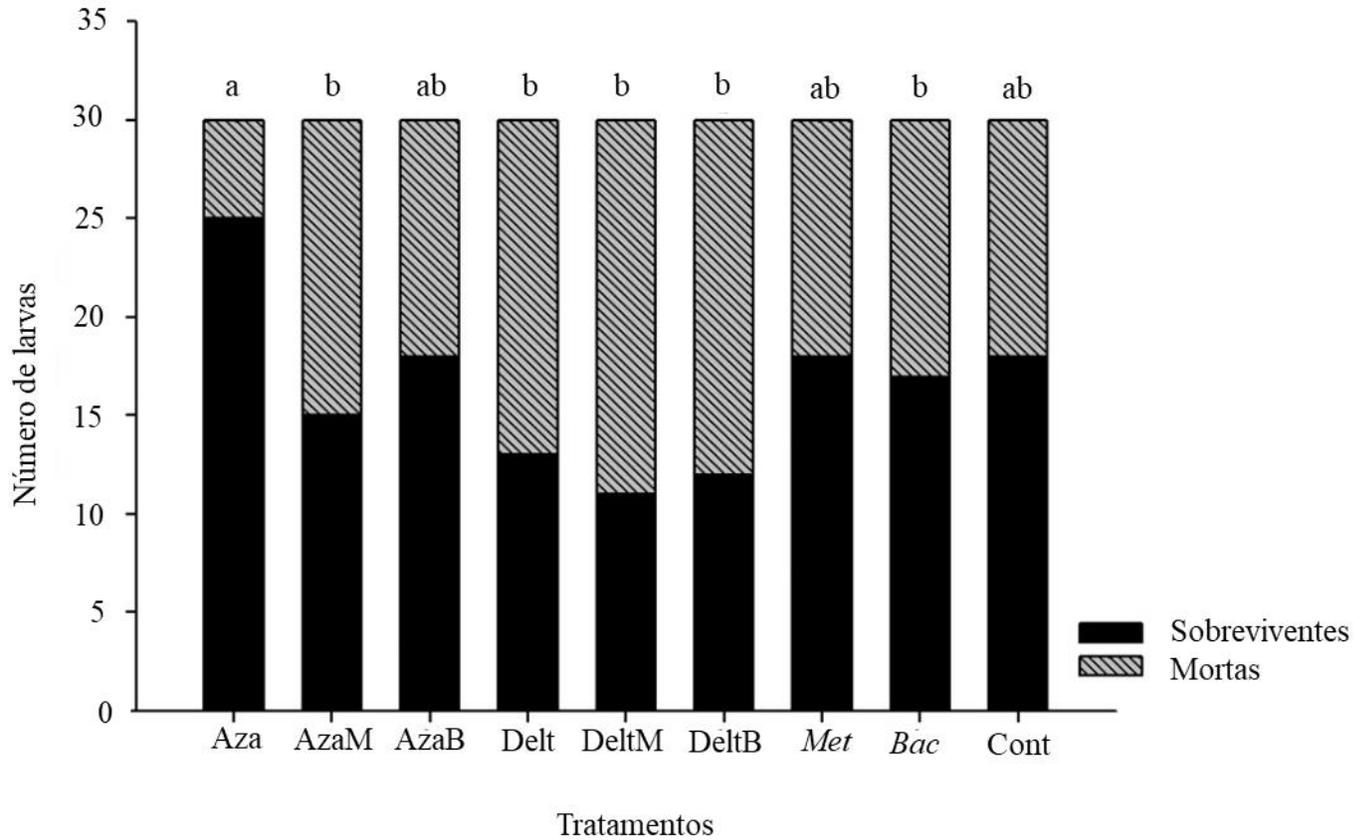


Figura 2. Número de larvas mortas e sobreviventes de *Spodoptera frugiperda* pulverizadas em laboratório com diferentes inseticidas e servidas como presas às ninfas de *Podisus nigrispinus* após 24 h. Aza, Azadiractina. AzaM, azadiractina + *M. anisoplae*. AzaB, azadiractina + *B. thuringiensis*. Delt, deltametrina. DeltM, deltametrina + *M. anisoplae*. DeltB, deltametrina + *B. thuringiensis*. Met, *M. anisoplae*. Bac, *B. thuringiensis*. Cont, controle. Colunas com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Fisher ($P > 0,05$).

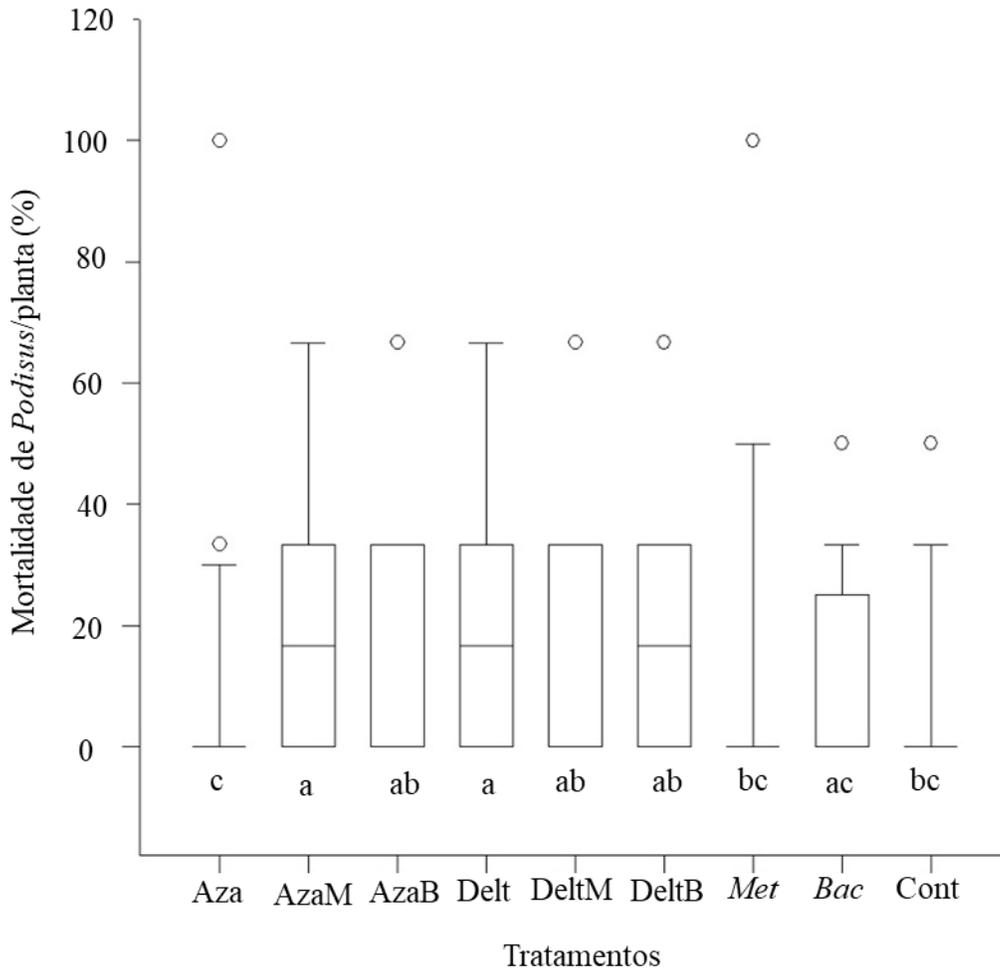


Figura 3. Taxa de mortalidade de *Podisus nigrispinus* em plantas tratadas com diferentes inseticidas em casa de vegetação após 72 h. Aza, Azadiractina. AzaM, azadiractina + *M. anisoplae*. AzaB, azadiractina + *B. thuringiensis*. Delt, deltametrina. DeltM, deltametrina + *M. anisoplae*. DeltB, deltametrina + *B. thuringiensis*. Met, *M. anisoplae*. Bac, *B. thuringiensis*. Cont, controle. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$)

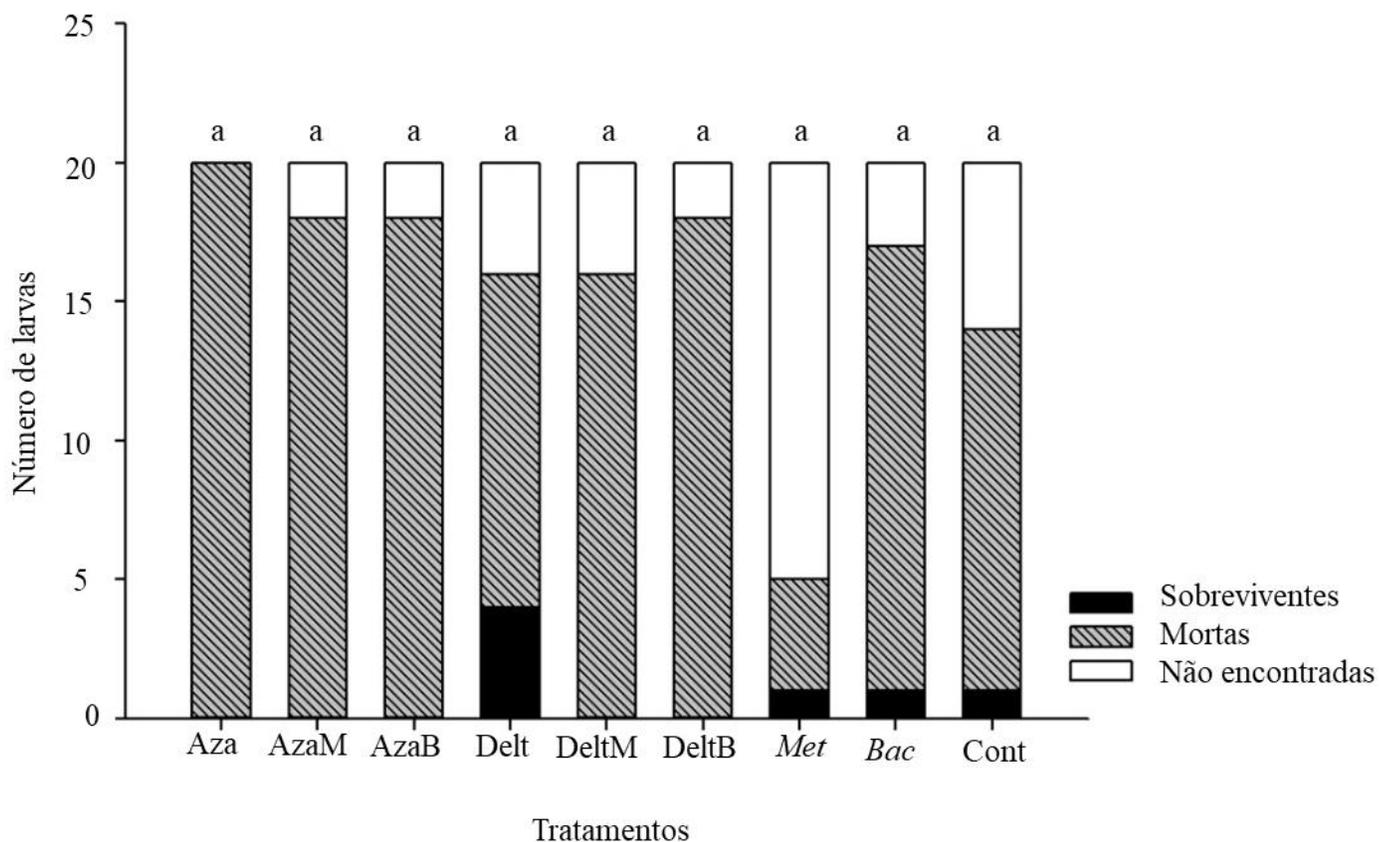


Figura 4. Número de larvas mortas e sobreviventes de *Spodoptera frugiperda* após plantas de milho tratadas com diferentes inseticidas e servidas como presas às ninfas de *Podisus nigrispinus* em casa de vegetação após 72 h. Aza, Azadiractina. AzaM, azadiractina + *M. anisoplae*. AzaB, azadiractina + *B. thuringiensis*. Delt, deltametrina. DeltM, deltametrina + *M. anisoplae*. DeltB, deltametrina + *B. thuringiensis*. Met, *M. anisoplae*. Bac, *B. thuringiensis*. Cont, controle. Colunas com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Fisher ($P > 0,05$). Larvas não encontradas não foram utilizados nos testes estatísticos.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A azadiractina apesar de ser um bioinseticida considerado seguro a inimigos naturais foi observado nesta pesquisa como um composto capaz de prejudicar o sistema imune do predador *Podisus nigrispinus*, reduzindo o número de hemócitos, em especial de pró-hemócitos e oenócitoides, levando à redução da atividade da fenoloxidase e dosagem de óxido nítrico, bem como redução dos níveis de proteínas do inseto. Porém, apesar de prejudicar seu sistema imune, a azadiractina se mostrou menos tóxica que o inseticida deltametrina, e apenas quando aplicado concomitante ao fungo *Metarhizium anisoplae*, foi capaz de aumentar a taxa de mortalidade deste inseto em casa de vegetação. Pesquisas como esta são necessárias para elucidar o modo de ação deste bioinseticida nos inimigos naturais e auxiliar na tomada de decisão do controle de pragas para que se utilizem métodos eficientes, mas que não seja capaz de prejudicar os insetos benéficos presentes no campo. Visto que os inimigos naturais fazem parte do alicerce e pilares do manejo integrado de pragas (MIP), é importante empregar práticas, como uma seletividade ecológica com o uso de áreas de refúgios e liberação do controle biológico após o período de persistência destes produtos, a fim de minimizar o máximo possível de danos a estes insetos.