



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* EM *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE): COMPATIBILIDADE E REPELÊNCIA A ÓLEOS VEGETAIS

KEILA DIOVANA OLIVEIRA BASTOS

São Luís - MA

2024



KEILA DIOVANA OLIVEIRA BASTOS

Engenheira Agrônoma

PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* EM *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE): COMPATIBILIDADE E REPELÊNCIA A ÓLEOS VEGETAIS

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências à obtenção do grau de Mestra em Agroecologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raimunda Nonata de Lemos Araujo.

São Luís - MA

2024



Bastos, Keila Diovana Oliveira.

Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE): compatibilidade e repelência com óleos vegetais. / Keila Diovana Oliveira Bastos. – São Luís, MA, 2024.

81 f.

Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Agroecologia) – Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, 2024.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata de Lemos Araujo.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA
KEILA DIOVANA OLIVEIRA BASTOS

PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* EM *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE): COMPATIBILIDADE E REPELÊNCIA A ÓLEOS VEGETAIS

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raimunda Nonata de Lemos Araujo (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA

Profa. Dra. Daniele Lavra Vieira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA)

Profa. Dra. Maria Rosangela Malheiros Silva
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA

A Deus, meu refúgio e socorro em todos os momentos.

Aos meus pais, Hosana Gloria de Oliveira e Ildeni Cardoso Bastos pela compreensão, amor e cuidado e aos meus irmãos Lucas de Oliveira Bastos e Guilherme de Oliveira Bastos.

Ao meu querido avô José Costa Duarte (*in memoriam*).

À menina que fui e à mulher que me tornei.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua misericórdia e favor imerecido, pelo consolo em momentos de dor, pelos caminhos que me fez trilhar, pelas batalhas que me ajudou a vencer e pelo abrigo quando eu não fui vitoriosa. Pela saúde suficiente para conclusão deste trabalho e por todos os momentos em que me fez lembrar que eu sou capaz, pela esperança e paz que traz ao meu coração, pela coragem para realizar os sonhos que me deu e por ser minha fonte inesgotável de amor e esperança de que dias melhores sempre virão.

Ao meu pai Ildeni Cardoso Bastos, pelo incentivo, apoio, amor e por todas as vezes que deixou seus compromissos para me acompanhar em viagens de coleta ou em finais de semana de avaliações. Seu apoio foi primordial, meu pai! Sem você eu não teria conseguido.

À minha mãe, Hosana Glória de Oliveira, por cuidar de mim, por ouvir as minhas queixas, por me acolher quando eu chorei, por me lembrar de que sou forte todas as vezes que eu dizia não aguentar. Espero um dia conseguir retribuir todo esse cuidado, mãe.

Ao meu filho de quatro patas Bolt, por tornar os meus dias mais felizes.

À minha querida orientadora, Professora Dra. Raimunda Nonata de Lemos Araujo, por ter me recebido com tanto carinho e cuidado, pelo exemplo de humildade, diligência e resiliência. Além de me orientar, me ouviu, me acolheu e compreendeu minhas limitações. Lhe tenho imensa admiração, professora!

À Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia, professores e funcionários.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Micoteca Gilson Soares da Silva, por ceder os isolados regionais para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Adriano Soares Rêgo, pelo auxílio nas análises estatísticas, apoio e instrução desde o início da minha jornada no mestrado.

À Aline Mascarenhas Vieira Mascarenhas pelo auxílio e companhia no laboratório.

À Kedma Rejane Gonçalves Machado, bolsista de apoio técnico, que se tornou uma grande amiga e me auxiliou em cada passo dessa importante trajetória.

Ao meu grupo de amigas pesquisadoras Myrella Katlhen, Maria Francisca e Kesia Silva (GB4), obrigada pelo companheirismo. Vocês são verdadeiros presentes em minha vida!

Aos professores Claudio Belmino Maia e Antônia Alice Costa Rodrigues, por terem cedido espaço no laboratório de Fitopatologia para que esta pesquisa fosse desenvolvida.

À Dra. Larisse Raquel Carvalho Dias, Dr. Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira e Dra. Erllen Keila Cândido e Silva, por terem me recebido tão bem no laboratório de Fitopatologia, pela disponibilidade e pelo apoio que foram fundamentais para o bom andamento desta pesquisa.

À Lays Batista, Ellen Aragão e Alaíde Lima, pela amizade e apoio no laboratório.

À Lisilene dos Santos e Grazielle Carvalho, minhas amigas e confidentes. Obrigada pelas conversas e apoio de sempre.

Ao meu querido amigo Hidelbrando Pires, por ser presente mesmo quando distante, por sempre me confortar e fazer rir em dias difíceis, pelo apoio e carinho de sempre.

Aos queridos Robert Felipe e Marianne Camille, que caminham comigo desde a graduação, por tornarem mais leves os meus dias com a sua preciosa amizade.

À Ociane Alves pelo apoio à minha pesquisa inicial, facilitando meu contato com os produtores do município de Vitória do Mearim e se prontificando para me auxiliar.

E a todos que estiveram ao meu lado contribuindo, torcendo, orando e emanando boas energias.

AGRADEÇO!

“O seu sol nunca se porá e a sua lua nunca desaparecerá, porque o Senhor será a sua luz para sempre, e os seus dias de tristeza terão fim... O mais pequenino se tornará mil, o menor será uma nação poderosa. Na hora certa Eu, o Senhor, farei acontecer depressa.”

Isaiás 60: 20, 22.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
<i>CAPÍTULO I</i>	15
REFERENCIAL TEÓRICO	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Controle biológico de insetos-praga e organismos entomopatogênicos	18
2.2. <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	20
2.3 Cenário atual dos micoinseticidas no Brasil.....	21
2.4 Compatibilidade entre entomopatógenos e óleos vegetais	22
2.5 Repelência de óleos vegetais.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
<i>CAPÍTULO II</i>	31
PATOGENICIDADE DE <i>Metarhizium anisopliae</i> E <i>Beauveria bassiana</i> EM LARVAS DE <i>Tenebrio molitor</i> (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Estabelecimento da criação de <i>Tenebrio molitor</i>	35
2.2 Obtenção de isolados	36
2.3 Repicagem do material biológico	36
2.4 Purificação dos isolados através da diluição seriada na potência de 10	37
2.5 Preparação do estoque de material fúngico para utilização nos bioensaios	38
2.6 Montagem e execução dos bioensaios	38
2.7 Isolamento de indivíduos mortos e confirmação de mortalidade pelos fungos.....	40
2.8 Análise estatística.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS.....	45
<i>CAPÍTULO III</i>	48

ANÁLISE DE COMPATIBILIDADE DOS ÓLEOS VEGETAIS DE NIM E ALGODÃO COM O ENTOMOPATÓGENO <i>Metarhizium anisopliae</i>, ISOLADO MGSS 192.....	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Incorporação dos óleos e inoculação do fungo.....	52
2.2 Diâmetro das colônias	53
2.3 Quantificação e análise de viabilidade de conídios.....	53
2.4 Determinação da compatibilidade ou toxicidade dos produtos.....	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
3.1 Diâmetro das colônias	54
3.2 Quantificação de conídios	57
3.3 Viabilidade de conídios.....	60
3.4 Determinação da compatibilidade e toxicidade dos óleos em relação ao isolado MGSS 192.....	62
4 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO IV.....	66
AÇÃO REPELENTE DOS ÓLEOS VEGETAIS DE NIM E ALGODÃO SOBRE <i>Tenebrio molitor</i> (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)	66
RESUMO.....	67
ABSTRACT	68
1 INTRODUÇÃO	69
2 MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1 Montagem das arenas.....	70
2.2 Delineamento experimental	70
2.3 Períodos de exposição.....	70
2.4 Análises estatísticas.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
5 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1. A) Inoculação inicial dos isolados; B) Diluição seriada na potência de 10 para purificação dos isolados; C) Placa cheia *Metarhizium anisopliae* MGSS 192; D) Placa cheia *Beauveria bassiana* IBCB 66.37

Figura 2. *Metarhizium anisopliae* MGSS 192 e *Beauveria bassiana* IBCB 66 esporulados em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae).41

Figura 3. Crescimento de *M. anisopliae* MGSS 192 predominantemente micelial quando exposto às concentrações 4% e 5% de óleo fixo de algodão 57

Capítulo III

Figura 1. Média obtida através da quantificação de conídios obtida nos tratamentos com óleo de nim (1% a 5%) 58

Figura 2. Médias obtidas através da quantificação de conídios nos tratamentos com óleo fixo de algodão (1% a 5%)..... 59

Figura 3. Valores (%) obtidos para viabilidade de conídios de *M. anisopliae* quando exposto à óleo de nim (1% a 5%), após 15 horas de inoculação 60

Figura 4. Valores (%) obtidos para viabilidade de conídios de *M. anisopliae* quando exposto à óleo fixo de algodão (1% a 5%), após 15 horas de inoculação61

Capítulo IV

Figura 1. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (3%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 72

Figura 2. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (4%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 73

Figura 3. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (5%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (1%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 74

Figura 5. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (2%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 75

Figure 6. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (3%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 75

Figura 7. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (4%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 76

Figura 8. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (5%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$). 76

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Isolados de fungos entomopatogênicos aplicados em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae)..... 36

Tabela 2. Concentrações obtidas para isolados dos fungos entomopatogênicos da Micoteca MGSS. 39

Tabela 3. Concentrações letais (CLs) (conídios/mL) dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Tenebrio molitor* estimadas com base em bioensaios de concentração/mortalidade..... 42

Capítulo III

Tabela 4. Proporção da diluição dos óleos vegetais..... 52

Tabela 5. Classificações do valor de T (Toxicidade) 54

Tabela 6. Efeito do óleo fixo de algodão (%) no diâmetro (cm) do isolado MGSS 192 em laboratório..... 55

Tabela 7. Efeito do óleo de nim (%) no diâmetro (cm) do isolado MGSS 192 em laboratório. 55

Tabela 8. Níveis de toxicidade/compatibilidade de acordo com o valor de T 63

PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* EM *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE): COMPATIBILIDADE E REPELÊNCIA A ÓLEOS VEGETAIS

RESUMO

O controle biológico é, além de um fenômeno natural, uma estratégia de manejo de pragas eficiente e de importância expressiva para o meio científico que é resultado de ações deliberadas pelo homem ou de ações não assistidas de forças naturais, consistindo no uso de parasitóides, predadores ou patógenos para suprimir uma população de pragas. Entre os organismos mais utilizados no controle biológico, destacam-se os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Dessa forma, o objetivo geral desta pesquisa foi determinar as concentrações letais dos isolados MGSS 192 de *M. anisopliae* e IBCB 66 de *B. bassiana* sobre o terceiro instar larval de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), além de realizar testes adicionais de compatibilidade e repelência com óleos vegetais. Posto isto, determinou-se a CL_{50} (intervalo de confiança) para *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66) em 138,61 conídios mL^{-1} (134,51–142,84) e de 155,35 conídios mL^{-1} (149,96–160,93) respectivamente, demonstrando que, apesar dos dois isolados terem sido patogênicos, o isolado MGSS 192 de *M. anisopliae* em menor concentração de conídios/mL proporcionou 50% de mortalidade nas larvas de terceiro instar de *T. molitor*. Nos testes de compatibilidade, os tratamentos com óleo de nim demonstraram-se compatíveis com o isolado MGSS 192 em todas as concentrações testadas, enquanto nos tratamentos com óleo fixo de algodão, obteve-se alta toxicidade nas concentrações 4% e 5%. Quanto à atividade repelente desses óleos em *T. molitor*, verificou-se que o óleo de nim manteve seu potencial em todos os intervalos de exposição (1h, 3h, 6h e 24h) nas cinco concentrações testadas (1%-5%), enquanto para as mesmas concentrações do óleo fixo do algodão, a atividade repelente manteve-se apenas até as 6 horas de exposição. Foram determinadas as concentrações letais médias 138,61 (134,51-142,83) e 155,35 conídios mL^{-1} (149,96–160,93) para *M. anisopliae* e *B. bassiana* respectivamente. Foi possível ainda identificar maior compatibilidade entre o óleo vegetal de Nim com os dois fungos testados; o mesmo também demonstrou maior potencial de repelência contra o terceiro instar de *T. molitor*.

PALAVRAS-CHAVE: MicoInseticidas; Larva da farinha; Controle Biológico; Inseticidas Botânicos.

PATHOGENICITY OF *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE): COMPATIBILITY AND REPELLENCE TO VEGETABLE OILS

ABSTRACT

Biological control is, in addition to a natural phenomenon, an efficient pest management strategy of significant importance for the scientific world that is the result of deliberate actions by man or unassisted actions of natural forces, consisting of the use of parasitoids, predators or pathogens to suppress a pest population. Among the organisms most used in biological control, the entomopathogens *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* stand out. Therefore, the general objective of this research was to determine the lethal concentrations of isolates MGSS 192 of *M. anisopliae* and IBCB 66 of *B. bassiana* on the third larval instar of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), in addition to carrying out additional compatibility and repellency with vegetable oils. That said, the LC₅₀ (confidence interval) was determined for *M. anisopliae* (MGSS 192) and *B. bassiana* (IBCB 66) in 138.61 conidia mL⁻¹ (134.51–142.84) and 155, 35 conidia mL⁻¹ (149.96–160.93) respectively, demonstrating that, although both isolates were pathogenic, the MGSS 192 isolate of *M. anisopliae* at a lower concentration of conidia/mL provided 50% mortality in larvae of third instar of *T. molitor*. In compatibility tests, treatments with neem oil were shown to be compatible with the MGSS 192 isolate at all concentrations tested, while treatments with fixed cottonseed oil showed high toxicity at concentrations of 4% and 5%. Regarding the repellent activity of these oils on *T. molitor*, it was found that neem oil maintained its potential in all exposure intervals (1h, 3h, 6h and 24h) in the five concentrations tested (1%-5%), while for the same concentrations of fixed cotton oil, the repellent activity was maintained only until 6 hours of exposure. The mean lethal concentrations of 138.61 (134.51–142.83) and 155.35 conidia mL⁻¹ (149.96–160.93) were determined for *M. anisopliae* and *B. bassiana*, respectively. It was also possible to identify greater compatibility between Neem vegetable oil and the two fungi tested; it also demonstrated greater repellency potential against the third instar of *T. molitor*.

KEY WORDS: Mycoinsecticides; Mealworm; Biological Control; Botanical Insecticides.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

O controle biológico é, além de um fenômeno natural, uma estratégia de manejo de pragas eficiente e de importância expressiva para o meio científico (Heimpel; Mills, 2017), que é resultado de ações deliberadas pelo homem ou de ações não assistidas de forças naturais, consistindo no uso de parasitóides, predadores ou patógenos para suprimir uma população de pragas (Van Driesche; Bellows, 2012). Existem três tipos de controle biológico, segundo Huffaker (2012): o clássico, onde os agentes de controle são inseridos em uma área onde a praga-alvo não possui inimigos naturais eficazes; natural, que consiste na soltura de inimigos das pragas existentes na lavoura, visando controlar naturalmente e manter o equilíbrio do ecossistema; e o artificial, em que os predadores são criados em laboratórios, em largas escalas, e liberados juntos à praga.

Nesse contexto, entre os microorganismos mais utilizados neste importante método de controle, destacam-se aqueles denominados entomopatógenos (Moraes, 2022). Entre os organismos agentes de controle biológico, cita-se o Vírus da Poliedrose Nuclear- VPN (Garavazi; Patroni, 2020; Freire, 2021), a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) que representa 90% do mercado mundial de bioinseticidas (Dantas; Ferreira, 2020) e os fungos que possuem grande variabilidade entre os isolados da mesma espécie, podendo apresentar diferentes níveis de similaridade genética e virulência e, diferentemente dos vírus e das bactérias, possuem ação por contato (Wiermann, 2022; Goulart *et al.*, 2022).

Entre as alternativas para o controle de pragas, os fungos entomopatogênicos desempenham um papel importante na supressão de insetos, considerando o seu amplo espectro de ação e sua capacidade de gerar epizootias (Sgarioni, 2021). Seu modo de ação é eficaz, uma vez que penetram no inseto através da cutícula (Maninno *et al.*, 2019) e após a penetração, o fungo se espalha pela hemocele (Flexner *et al.*, 1986), produzindo altas quantidades de toxinas dentro do hospedeiro, de modo a causar paralisia e morte nos insetos para, depois, colonizar o corpo e produzir esporos na superfície do mesmo (Altinoki *et al.*, 2019). Além de sua eficiência no modo de ação, esses organismos ainda atendem os princípios do manejo integrado de pragas (MIP), e retardam o processo de resistência de pragas a inseticidas, promovendo a preservação de inimigos naturais (Rubio; Souza; Pereira, 2021).

Por este viés, Sani *et al.* (2020), discutem sobre o importante papel dos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metsch) e *Beauveria bassiana* (Bals.) no controle de pragas agrícolas, já conhecidos no mercado de controle biológico uma vez que, alguns isolados destes fungos já fazem parte de formulações biológicas comerciais (Sullivan; Parker;

Skinner, 2022). Resultados como os obtidos por Fite *et al.* (2022) confirmam a patogenicidade dos isolados APPRC-9604, APPRC-T5 e DLCO-EA-56 de *B. bassiana* e DLCO-EA-40 de *M. anisopliae* no controle do terceiro instar de *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), determinando uma concentração letal média (CL₅₀) de $1,3 \times 10^4$ conídios/mL para o isolado APPRC-9604 que foi mais eficaz no controle da população larval.

Nesse sentido, destaca-se o *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae), caracterizado por sua capacidade de se reproduzir rapidamente. *Tenebrio molitor* possui um ciclo de vida composto por quatro estágios: ovo, larva, pupa e inseto adulto, sendo o estágio larval composto por cinco instares (Marques *et al.*, 2021). Também conhecido como larva da farinha, este inseto é considerado uma praga comum em grãos armazenados que pode gerar danos significativos uma vez que, são capazes de contaminar os grãos através de seus excrementos e de causar danos físicos ao estoque, levando a deterioração dos produtos armazenados (Rumbos *et al.*, 2024). Por outro lado, além de sua importância econômica como praga agrícola, Gkinali *et al.* (2022), destacam o potencial das larvas de *T. molitor* para tratar deficiências de proteína alimentar convencional, devido ao seu importante conteúdo de proteína, lipídios, vitaminas e minerais, podendo ser utilizadas ainda como ingredientes futuros para fins industriais. Além disso, Parra (2019) evidencia, que *T. molitor* também se constitui de importante ferramenta na análise de patogenicidade de fungos.

Dessa forma, é válido ressaltar que a patogenicidade de fungos depende, entre outros fatores, do inseto-praga que se deseja controlar e do isolado fúngico utilizado. Além disso, como destacam Machado e Pimentel (2021), existem meios de potencializar o crescimento e a ação de organismos fúngicos. Em estudos como os de Celestino *et al.* (2020), avaliou-se compatibilidade *in vivo* entre óleo de mamona e *B. bassiana* na broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Santos (2023), também demonstrou que houve compatibilidade entre os extratos vegetais e o fungo entomopatogênico *B. bassiana* ao avaliar sua viabilidade em laboratório. Com base nos resultados de Paula *et al.* (2019), é também possível observar que a combinação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com óleo de nim (*Azadirachta indica*) aumenta efetivamente a meia-vida e a virulência do fungo quando testado contra larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), mesmo sob condições de campo simuladas.

Nesse contexto, existem também trabalhos que exploram o potencial de óleos vegetais como repelentes naturais. Joshi *et al.* (2019), avaliaram o potencial de repelência de óleo de nim nas concentrações 1%, 2% e 3% contra *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:

Tenebrionidae) e *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) e verificaram que a capacidade repelente do óleo foi proporcional à concentração utilizada. Macchioni *et al.* (2019), confirmam ainda a eficiência do óleo de nim como repelente de mosquitos *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), demonstrando potencial para ser também um potencializador da ação de entomopatógenos.

Sendo assim, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas acerca da patogenicidade de fungos contra pragas agrícolas, bem como explorar métodos que potencializem sua ação. Diante do exposto, esta pesquisa foi executada com vistas a explorar a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, bem como realizar testes adicionais visando explorar o potencial de compatibilidade de óleos vegetais com entomopatógenos e seu grau repelência em *T. molitor*, sob o objetivo geral de determinar as concentrações letais médias (CL's 50) de *M. anisopliae* MGSS 192 e *B. bassiana* IBCB 66 sobre o terceiro instar larval de *T. molitor*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Controle biológico de insetos-praga e organismos entomopatogênicos

O controle biológico é a utilização de organismos vivos visando combater patógenos, pragas e plantas espontâneas para fornecer, além de maior sustentabilidade ao meio ambiente, benefícios humanos (Van Driesche; Bellows, 2012). Como acrescentam Pacheco *et al.* (2019), é ainda considerado um método de manejo compatível com as necessidades do meio ambiente tanto pela viabilidade econômica que oferece aos agricultores quanto pela proteção dos recursos ambientais e à saúde dos consumidores. Neste método, estão inseridas diversas práticas de manejo para fins de proteção de inimigos naturais em um agroecossistema, aumentando a capacidade de ação dos mesmos e o seu impacto na população de pragas, além de representar uma alternativa à utilização de agroquímicos sintéticos que causam diversos danos ambientais e riscos à saúde humana (Stemberg *et al.*, 2021; Shields *et al.*, 2019).

O controle biológico é considerado como um fenômeno natural que controla a densidade populacional de insetos-praga pelo uso de inimigos naturais (Reis, 2018). Os estudos com esses organismos para o controle de pragas agrícolas têm se mostrado bastante eficazes e a importância de se debater e abordar sobre este método de controle na agricultura está relacionada à necessidade de entender esse conhecimento como um processo de busca constante (Cruz; Silva, 2019). No entanto, apesar de ocorrer naturalmente e não ser considerado um método recente, esse tipo de manejo ainda é pouco conhecido pelos produtores; o conhecimento dos agricultores acerca do controle biológico e suas percepções sobre a

contribuição desse tipo de manejo na biodiversidade bem como para o controle de pragas têm sido, muitas vezes, negligenciados já que atualmente o controle de pragas agrícolas ainda depende do uso intenso de inseticidas químicos (Amancio, 2019; Wang *et al.*, 2019; Matinez-Sastre *et al.*, 2020).

Tendo em vista os efeitos negativos destes últimos, a preocupação em desenvolver novas práticas de controle que respeitem os limites e recursos ambientais tem tomado proporções mundiais. Como descreve Wang *et al.* (2019), na China por exemplo, “a promessa do controle biológico atraiu a atenção do governo e os fundos para apoiar muitos programas nacionais de pesquisa”. Ainda de acordo com o mesmo autor, em 2013, a China lançou dois programas de apoio a pesquisa dentro campo do controle biológico: a “Pesquisa Básica sobre Controle Biológico de Nematóides Patogênicos de Culturas Chave” e o “Mecanismo de Controle de Pragas por Inimigos Naturais e sua Utilização Sustentável”, assim servindo de modelo para o resto do mundo, visto que investir em métodos de controle alternativos significa investir na manutenção da biodiversidade como um todo.

Sforza (2021), acrescenta ainda, que existe uma diversidade de agentes que podem ser utilizados dentro das práticas de controle biológico de pragas, com destaque para os fungos entomopatogênicos por apresentarem vantagens significativas no desempenho dessa função (Reis, 2018).

Nesse sentido, eficácia dos fungos como agentes de controle biológico (entomopatogênicos) se deve, principalmente, ao fato de que estes são patógenos de largo espectro de ação, capazes de colonizar diversas espécies de insetos e de causar com frequência, epizootias em condições naturais. Além disso, atendem aos princípios do Manejo Integrado de Plantas - MIP, retardam o processo de resistência de pragas a inseticidas e promovem a preservação de inimigos naturais (Alves, 2008; Rubio; Souza; Pereira, 2021).

Desse modo, López e Osório (2019), evidenciaram em sua pesquisa os entomopatógenos *B. bassiana* e *M. anisopliae* como organismos úteis para o controle de pragas agrícolas, devido à capacidade que ambos apresentam de causar infecções em níveis suficientes para reduzir uma população de pragas (Lima, 2021). Loureiro *et al.* (2022), confirmaram o potencial patogênico das cepas IBCB 21 e IBCB 07 de *B. bassiana* contra *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. Torres *et al.* (2020), avaliaram o potencial de *M. anisopliae* sobre larvas e adultos de *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae), constatando que o fungo pode ser utilizado como estratégia de controle nas duas fases submetidas aos tratamentos, visto que, demonstrou alta patogenicidade.

Vale destacar que estes fungos são capazes de colonizar grande parte dos insetos, ocorrendo de forma a lhes provocar epizootias, podendo causar infecção via tegumento, via sistema digestório ou respiratório. Uma vez no hospedeiro, começam a formar tubos germinativos que se estendem por todo o tegumento do inseto e, dessa forma, ao se multiplicar causam a morte do inseto por falta de nutrientes, para então esporular sobre o cadáver (Hernandez *et al.*, 2019). Esse processo de infecção do hospedeiro pelo fungo é resumido por Dannon *et al.* (2020), em quatro etapas: adesão, diferenciação, penetração e disseminação, sendo a adesão caracterizada pela germinação dos conídios já fixados à cutícula do hospedeiro; a diferenciação caracterizada pelo estabelecimento do apressório que favorecerá a penetração; a penetração que corresponde ao momento em que o fungo alcança a hemolinfa do hospedeiro e, por último, a disseminação que corresponde ao momento da esporulação para dispersão.

Por suas características e modo de ação, diferentes isolado de *M. anisopliae* e *B. bassiana* vem demonstrando alto potencial patogênico e estão entre os mais estudados dentro de programas de controle biológico já que se demonstram tão eficientes quanto pesticidas químicos no controle de determinadas pragas. Resultados satisfatórios tem sido observado no controle de pragas do algodoeiro, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *H. hampei*, com a vantagem de terem seu potencial biotecnológico amplamente explorado pela expressão de genes e como fonte de novos biocatalisadores (Dannon *et al.*, 2020; Amobonye *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2021; Pedrini *et al.*, 2022; Idrees *et al.*, 2022).

2.2 *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Tenebrio molitor é uma espécie de besouro de fácil reprodução que possui quatro estágios de vida: ovo, larva, pupa e adultos sendo o estágio larval composto por cinco instares. Suas larvas são ricas em aminoácidos essenciais, especialmente metionina, lipídios e ácidos graxos essenciais que variam de acordo com o seu desenvolvimento (Hong; Han; Kim, 2020). Também conhecido como larva da farinha, este inseto é considerado uma praga comum em grãos armazenados que pode gerar danos significativos uma vez que, são capazes de contaminar os grãos através de seus excrementos e de causar danos físicos ao estoque, levando a deterioração dos produtos armazenados (Rumbos *et al.*, 2024).

Apesar de representar importância agrícola enquanto praga, os estudos acerca deste inseto se concentram especialmente na avaliação de sua parte nutricional, já que pode ser utilizado como uma importante fonte de proteína na alimentação (Wu *et al.*, 2020; Gkinali *et*

al., 2022). Estudos vêm sendo desenvolvidos acerca do desempenho de *T. molitor* em diferentes dietas. Rumbos *et al.* (2020), analisaram a composição de nutrientes das larvas depois de terem sido submetidas à diferentes dietas, constatando que a alimentação em substratos selecionados impactou a composição nutricional das larvas de *T. molitor*.

Outras pesquisas também comprovam a eficiência de larvas de *T. molitor* como isca ou “*Bait Method*” para isolar fungos entomopatogênicos e ainda em trabalhos de prospecção de entomopatógenos para desenvolvimento de bioformulados (Shafique *et al.*, 2021; Domingues *et al.*, 2023). Eski e Gezgi (2022), confirmam a suscetibilidade de todas as fases deste inseto à diferentes isolados de *B. bassiana* e comprovam sua eficácia quanto ao isolamento de fungos, exercendo o seu papel de isca. Siqueira *et al.* (2019), compara o potencial patogênico de *Isaria fumorosea* e o potencial de controle do óleo de nim em larvas de *T. molitor*, ressaltando a importância de que mais estudos comparativos sejam desenvolvidos neste sentido. Neste cenário, o entomopatógeno *M. anisopliae* também teve sua virulência avaliada nos instares larvais de *T. molitor* a partir de estudos de Altahawi *et al.* (2020), demonstrando a patogenicidade dos isolados M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 e M9, que ocasionaram 64% de mortalidade nas larvas e evidenciando a utilização do inseto na prospecção de isolados fúngicos, como uma importante contribuição para o mercado de controle biológico.

Sendo assim, *T. molitor* constitui importante ferramenta no que diz respeito à análise de patogenicidade de fungos entomopatogênicos, contribuindo também para formulação de novos bioprodutos uma vez que, em nível mundial, o controle biológico aumentou de 10 a 15% por ano e a busca por novos produtos e organismos-base para essas formulações é constante (Parra, 2019).

2.3 Cenário atual dos micoinseticidas no Brasil

Desde a década de 1970, a produção de agentes de controle biológico passou de uma indústria artesanal para instalações profissionais de pesquisa e produção. Muitos agentes eficientes foram identificados, protocolos de controle de qualidade, produção em massa, métodos de embarque e liberação amadurecidos e orientação adequada para os agricultores foi desenvolvida (Van Lenteren *et al.*, 2020). A produção de bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos, no entanto, possui uma série de desafios que vão desde a pesquisa dos isolados até o processo de produção (Almeida, 2020).

Em nível nacional, o crescimento gradativo na produção desses bioprodutos, se dá, principalmente, pelo interesse das multinacionais, já que vem aumentando a preocupação

mundial com métodos que garantam maior sustentabilidade no manejo de sistemas agrícolas e no meio ambiente em geral, por isso, o mercado do controle biológico é uma das áreas que mais crescem dentro da Entomologia em nosso país (Almeida *et al.*, 2019). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a produção de produtos biológicos para controle de pragas e doenças agrícolas no Brasil cresceu mais de 70% no último ano, movimentando cerca de R\$ 464,5 milhões ante R\$ 262,4 milhões em 2017, apresentando um crescimento de 17% no mesmo período (Brito, 2019).

Por outro lado, embora seja forte no setor agropecuário, o Brasil ainda possui poucos produtos de Controle Biológico no mercado e, conseqüentemente o controle de pragas utilizando produtos naturais ainda é pouco utilizado. Isso se deve à resistência em relação a utilização do controle biológico pela pressão das grandes empresas de agroquímicos e pela cultura do agricultor brasileiro que, infelizmente, se acostumou com a aplicação de produtos químicos, ao longo de décadas, para controlar as pragas (Amancio, 2019; Parra, 2019). Daí a necessidade de que se intensifiquem os estudos para exploração do potencial de novos isolados de fungos, favorecendo o incremento na produção de bioprodutos através de novas formulações.

2.4 Compatibilidade entre entomopatógenos e óleos vegetais

A compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e óleos vegetais tem ganhado espaço no meio científico, uma vez que se apresenta como uma estratégia promissora para o controle biológico de pragas agrícolas. Saikia *et al.* (2023), avaliou a compatibilidade entre *B. bassiana* e os óleos vegetais de nim, laranja (*Citrus Sinensis Osbeck* – Rutaceae), citronela (*Cymbopogon nardus*) e pinhão-mansão (*Jatropha curcas L.*), considerando os parâmetros de tamanho das colônias, produção de conídios, esporulação e cálculo de toxicidade, constatando diferentes níveis de compatibilidade em todos os óleos testados, exceto nos tratamentos com óleo de pinhão-mansão que apresentou toxicidade moderada, afetando a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*.

De acordo com Machado e Pimentel (2021), os níveis de compatibilidade e toxicidade entre entomopatógenos e óleos vegetais podem variar de acordo com o óleo vegetal e as concentrações em que eles estão sendo utilizados. Como destaca Khun *et al.* (2021), existe um índice que determina o nível de compatibilidade onde valores de 0 a 41 representam toxicidade, de 42 a 66 indicam toxicidade moderada e valores maiores que 66 correspondem à compatibilidade. Puspitarini *et al.* (2022), avaliou a compatibilidade do extrato de semente de *J. curcas* e do entomopatógeno *Akanthomyces lecanii* contra o ácaro vermelho, incorporando o

extrato vegetal em meio composto por batata, dextrose e ágar (BDA) e inoculando o fungo para análise de seu crescimento micelial e viabilidade de conídios; dessa forma, os autores constataram alta compatibilidade entre o extrato e o entomopatógeno.

Outros estudos como o de Paula *et al.* (2019), também sugerem que a aplicação combinada entre entomopatógenos e óleos vegetais como adjuvantes pode ser uma maneira mais eficaz de controlar populações de insetos-praga; em seus estudos, demonstraram que uma combinação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com óleo de nim aumenta efetivamente a meia-vida e a virulência do fungo quando testado contra larvas de *A. aegypti*. demonstrou moderadamente tóxico.

Elhalawany, Ahmad e Ali (2022), testaram a compatibilidade entre o óleo de nim e óleo de cominho (*Nigella sativa*) com os entomopatógenos *M. anisopliae* e *B. bassiana* e constataram que, apesar de o óleo de cominho ter demonstrado maior eficácia contra o ácaro *Eutetranychus orientalis* (Klein, 1936) quando aplicado em conjunto com o fungo, ao ser avaliado considerando o crescimento micelial do entomopatógeno, ele se demonstrou moderadamente tóxico.

Dessa forma, alguns estudos indicam que óleos vegetais podem melhorar a eficácia dos fungos entomopatogênicos, aumentando a mortalidade dos insetos alvo, enquanto outras pesquisas alertam para possíveis efeitos negativos, como a inibição do crescimento fúngico em determinadas condições (Machado; Pimentel, 2021). Por isso, a escolha adequada do tipo de óleo, sua concentração e o método de aplicação são fundamentais para maximizar os benefícios e minimizar os possíveis efeitos adversos, de modo que os efeitos representem uma estratégia eficaz para o controle biológico de pragas.

2.5 Repelência de óleos vegetais

Além de seu uso como adjuvante de fungos entomopatogênicos, os óleos vegetais também estão presentes em estudos que exploram seu potencial como repelente (Coelho; Leal; Vasconcelos, 2019). Isso se dá devido às propriedades que alguns óleos possuem, como ressaltam Santos *et al.* (2022), um bom exemplo é o óleo de nim, rico em azadiractina que além de conferir excelente propriedade repelente, também garante ampla ação inseticida. Canedo (2020), destaca ainda o óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), rico em cineol, também conhecido por suas propriedades repelentes. Outros estudos também confirmam a eficiência de

óleo de citronela, extraído de plantas do gênero *Cymbopogon*, como repelente (Medeiros *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023).

Estudos como o de Nisbet *et al.* (2000) revisaram o modo de ação da azadiractina e sua eficácia contra mais de 200 espécies de insetos e ressaltaram que o óleo de Nim age diretamente na inibição da alimentação, interferência no desenvolvimento e repelência. Nesse sentido, Sharma *et al.* (2005) também relataram a eficácia do óleo de Nim contra *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de algodão. Trongtokit *et al.* (2005) compararam a eficácia de diferentes óleos essenciais, incluindo citronela, e encontraram alta repelência contra mosquitos *A. aegypti*. Atrelado a este resultado, em seus estudos Nerio *et al.* (2010) realizaram um levantamento sobre a eficácia de óleos essenciais como repelentes de insetos, destacando a citronela como um dos mais eficazes, uma vez que possui alta volatilidade, interferindo diretamente na capacidade sensorial dos insetos.

O óleo de algodão é outro óleo vegetal que tem sido estudado por suas propriedades repelentes e inseticidas. Ele contém ácidos graxos essenciais e compostos como gossypol, que podem ter efeitos repelentes contra insetos praga. Estudos como o de Shahid e Naczk (2003), têm mostrado que gossypol pode ser tóxico para pragas de grãos armazenados, como o gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae). Além disso seu potencial também tem sido explorado em combinação com outros óleos essenciais para aumentar a eficácia repelente (Tripathi *et al.*, 2000).

A eficácia dos óleos vegetais como repelentes de insetos depende diretamente de fatores como tipo e concentração do produto, modo de aplicação – se por pulverização direta, uso em armadilhas ou aplicação no solo – e condições ambientais como temperatura, umidade e vento que podem influenciar na volatilidade e persistência dos óleos (Coelho; Leal; Vasconcelos, 2019). Dessa forma, os óleos de origem vegetal são uma alternativa promissora e ecológica para a repelência de insetos praga. Sua utilização pode contribuir para a redução do uso de pesticidas químicos, promovendo um controle mais sustentável e seguro das pragas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. E. M. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 2444-2557, 2020.

ALTAHAWI, A. G. *et al.* Efficacy of New Isolates of Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), from Sinai Peninsula against Yellow Mealworm *Tenebrio molitor* L.

(Coleoptera: Tenebrionidae) under Laboratory Conditions. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 11, n. 12, p. 687-691, 2020.

ALTINOK, H. H. *et al.* Modes of action of entomopathogenic fungi. **Current Trends in Natural Sciences**, v. 8, n. 16, p. 117-124, 2019.

ALVES, S. B. *et al.* Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, p. 69-110, 2008.

ALVES, T. M. *et al.* **Distribuição espacial do percevejo-do-colmo (*Tibraca limbativentris* Stål) em arroz irrigado**. Goiânia, 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiânia, Programa de Pós-graduação em Agronomia, 2012.

AMOBONYE, A. *et al.* Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1019-1034, 2020.

ARAUJO, L. S. *et al.* **Conservação da Biodiversidade do Estado do Maranhão: cenário atual em dados geoespaciais**. Infoteca, EMBRAPA, 2016.

AZEVEDO, E. B. **Efeito dos cultivos agrícolas na diversidade de ácaros predadores Mesostigmata e prospecção para uso no controle biológico**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2021.

BARRA-BUCAREI, L. *et al.* *Beauveria bassiana* multifunction as an endophyte: Growth promotion and biologic control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 591, 2020.

CANEDO, I. S. D. **Investigação sobre o efeito repelente dos óleos naturais de citronela e eucalipto-limão e o papel dos receptores ionotrópicos na identificação de moléculas repelentes em triatomíneos**. Belo Horizonte: 2020. 75 p. cd. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde. Área de concentração: Transmissores de Patógenos) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

CASSETTARI, G. A.; QUEIROZ, T. M. Balanço hídrico e classificação climática na bacia do rio jauquara, região de transição entre o cerrado e amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Climatologia**, 26. 2021.

CELESTINO, F. N. *et al.* In vivo compatibility between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin and castor oil on *Hypothenemus hampei* (Ferrari). **Coffee Science**, 15:e151771, 2020.

CHANG, Ju-Chun *et al.* Construction and selection of an entomopathogenic fungal library from soil samples for controlling *Spodoptera litura*. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 596316, 2021.

COELHO, A. G.; LEAL, E. R.; VASCONCELOS, J. F. S. Emprego de óleos essenciais como matéria-prima para a produção de repelentes de insetos. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 37, p. 178-182, 2019.

- CRUZ, C. A. B.; SILVA, P. H. G. Controle biológico de pragas: análise de perspectivas conceituais. In: **10ª JICE-JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E EXTENSÃO**. 2019.
- DANNON, H. F. *et al.* Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. **Journal of Cotton Research**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2020.
- DANTAS, G. V.; FERREIRA, T. C. Baculovírus: um vírus versátil usado no controle biológico e como vetor de expressão de proteínas heterólogas aplicadas na saúde humana. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 7, n. 13, p. 28-40, 2020.
- DOMINGUES, M. M. *et al.* Diversidade de fungos entomopatogênicos em solos de culturas de eucalipto e soja e área de mata nativa. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2023.
- ELHALAWANY, A. S.; AHMAD, N. F.; ALI, S. S. Patogenicidade de dois fungos entomopatogênicos e toxicidade, impedimento de oviposição e repelência de dois óleos essenciais em *Eutetranychus orientalis*. **Acarines: Journal of the Egyptian Society of Acarology**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2022.
- ESKI, Ardahan; G., Muhammed M. Susceptibility of different life stages of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to indigenous entomopathogenic fungi. **Journal of Stored Products Research**, v. 98, p. 102008, 2022.
- FERNANDES, T. A. *et al.* **Potencial de isolados de *Bacillus thuringiensis* para controle de fungos fitopatogênicos e promoção de crescimento vegetal**. 2019.
- FITE, T. *et al.* Evaluation of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Bacillus thuringiensis* for the management of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 278-295, 2020.
- FREIRE, G. A. L. **Vírus da Poliedrose Nuclear (VPN) em soja: uma avaliação de campo para *Chrysodeixis includens* de maiores tamanhos**. Trabalho de conclusão de curso, Instituto Federal Goiano. 2021.
- GARAVAZI, F.; PATRONI, E. Comparativo do controle biológico e químico de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho. **Revista Ensaios Pioneiros**, v. 4, n. 1, p. 89-98, 2020.
- GKINALI, A. A. *et al.* Potentiality of *Tenebrio molitor* larva-based ingredients for the food industry: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 495-507, 2022.
- GOULART, L. S. *et al.* **Ação de bioinseticidas formulados a partir de fungos entomopatogênicos sobre diferentes fases de desenvolvimento de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) e biologia comparada com *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Hemiptera: Aphididae)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2022.
- HEIMPEL, G. E.; MILLS, N. J. Controle biológico. **Cambridge University Press**, 2017.
- HONG, J. *et al.* Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: A review. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2068, 2020.

HUFFAKER, C. B. **Theory and practice of biological control**. Elsevier, 2012.

IDREES, A., *et al.* Bioassays of *Beauveria bassiana* isolates against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, p. 717, 2022.

JOSHI, R. *et al.* Repellency of neem oil against red rust flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) and lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius)(Coleoptera: Bostrichidae). **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 8, n. 1, p. 521-524, 2019.

KHUN, K. *et al.* Compatibility of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* with insecticides and fungicides used in macadamia production in Australia. **Pest Management Science**, v. 77, n. 2, p. 709-718, 2021.

LIMA, L. M. R. **Beauveria bassiana e Metarhizium anisopliae no controle de Planococcus sp. na cultura do cafeeiro em condições de campo**. 2021. Monografia (Graduação) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, 2021.

LÓPEZ, M. A. C.; OSORIO, J. W. M. Compatibility of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with *Chrysoperla externa* depredator of *Trialeurodes vaporariorum*. **Chilean journal of agricultural & animal sciences**, v. 35, n. 1, p. 38-48, 2019.

LOUREIRO, E. *et al.* Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in laboratory conditions. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e41011225831-e41011225831, 2022.

MACHADO, C. M. B.; PIMENTEL, I. C. Biocompatibility of fungi and essential oils or vegetable extracts: a bibliometric review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e405101119874-e405101119874, 2021.

MANNINO, M. C. *et al.* Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 33, 2019.

MARQUES, C. G. *et al.* Proteínas alternativas como ingrediente de enriquecimento de alimentos: uma revisão da larva de tenebrio comum (*Tenebrio molitor*). **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil**, v. 2, p. 79-97, 2021.

MARTÍNEZ-SASTRE, R. *et al.* Farmers' perceptions and knowledge of natural enemies as providers of biological control in cider apple orchards. **Journal of Environmental Management**, v. 266, p. 110-589, 2020.

MEDEIROS, A. C. R. *et al.* Efeitos repelentes da *Cymbopogon nardus* para o *Aedes aegypti*: uma revisão rápida. **Revista Científica da Escola Estadual de Saúde Pública de Goiás "Cândido Santiago"**, v. 9, p. 1-17 9i5, 2023.

MEIRELES, G. B. **Relações entre a abordagem da ecologia da restauração e o ODS 15: um estudo sobre os impactos antrópicos na Mata Atlântica**. Dissertação (mestrado). PUC Campinas, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade, São Paulo, 2021.

MENEZES, P. I. **Pseudomonas aeruginosa: fixação biológica do nitrogênio, promoção de crescimento, sanidade e produção de arroz de terras altas no estado do Maranhão**.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, 2020.

MORAES, S. C. S. *et al.* **Avaliação de patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em formigas do gênero *Atta* spp. utilizando aprendizado de máquina.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2022.

NERIO, L. S. *et al.* Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.

NISBET, A. J. *et al.* Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 615-632, 2000.

NOVAIS, G. T. **Classificação climática aplicada ao Bioma Cerrado.** Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

OLIVEIRA, J. *et al.* Fungos, diversidade e prospecção no Brasil: Um recurso pouco explorado? **Metodologias e Aprendizado**, v. 4, p. 149-163, 2021.

PACHECO, H. *et al.* Organismos entomopatogênicos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. **Revista mexicana de ciências forestales**, v. 10, n. 56, p. 4-32, 2019.

PARRA, J. R. P. Controle biológico na agricultura brasileira. **Entomological Communications**, v. 1, p. 2675-1305, 2019.

PAULA, A. R. *et al.* Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-9, 2019.

PEDRINI, N. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within insects: expression of genes encoding secondary metabolites during pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 488, 2022.

PENG, G., *et al.* Long-term field evaluation and large-scale application of a *Metarhizium anisopliae* strain for controlling major rice pests. **Journal of Pest Science**, v. 94, p. 969-980, 2021.

PUSPITARINI, R. D. *et al.* Compatibility of *Jatropha curcas* seed extract and entomopathogenic fungus *Akanthomyces lecanii* against the citrus red mite *Panonychus citri*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 32, n. 3, p. 299-313, 2022.

RUBIO, G. O.; SOUZA, E. C.; PEREIRA, R. M. Eficiência da utilização de fungos entomopatogênicos no controle de *Euschistus heros* na cultura da soja. In. **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar.** 2021

RUMBOS, C. I. *et al.* Evaluation of various commodities for the development of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 11224, 2020.

- SAIKIAA, B. *et al.* Compatibility study of entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) with promising plant oils. **Agricultural, mechanization in Asia**, 2023.
- SALES-CAMPOS, C. *et al.* Cultivo experimental de Basidiomicetos causadores de podridão branca da região Amazônica em diferentes substratos. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 1, p. 193-206, 2022.
- SANI, I. *et al.* A review of the biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 619, 2020.
- SANTOS, C. A. S. *et al.* Conhecimento ambiental de trabalhadores rurais sobre o uso de agrotóxicos em um assentamento do município de Açailândia (Maranhão). **Educação Ambiental (Brasil)**, v. 2, n. 2, 2021.
- SANTOS, C. R. *et al.* **Diversidade e estrutura do sub-bosque de florestas ecotonais no Maranhão: relações fitogeográficas e influência do meio urbano.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2022.
- SANTOS, J. R. N. *et al.* Tendências de extremos climáticos na região de transição Amazônia-Cerrado no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 26, 2020.
- SANTOS, M. F. dos *et al.* Bioeficácia de produtos à base de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no manejo de *Oligonychus punicae* (Acari: Tetranychidae) em eucalipto. **Ciência Florestal**, v. 32, p. 1078-1094, 2022.
- SANTOS, W. I. *et al.* Desenvolvimento de Produtos Naturais com Potencial Repelente para a Prevenção à Dengue. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 27, n. 2, p. 136-145, 2023.
- SFORZA, R. F. H. The diversity of biological control agents. **Biological control: A global endeavour (PG Mason ed.). CSIRO Publishing, Canberra**, 2021.
- SGARIONI, E. **Prospecção de agrupamentos gênicos conservados associados à síntese de metabólitos secundários em fungos entomopatogênicos.** Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.
- SHAFIQUE, L. *et al.* A viabilidade do uso de larvas de farinha amarela (*Tenebrio molitor*): Rumo a uma indústria sustentável de rações aquáticas. **Animais**, v. 11, n. 3, p. 811, 2021.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. **CRC press**, 2003.
- SHARMAD, H. C. *et al.* Antibiosis mechanism of resistance to pod borer, *Helicoverpa armigera* in wild relatives of chickpea. **Euphytica**, v. 142, p. 107-117, 2005.
- SHIELDS, M. W. *et al.* History, current situation and challenges for conservation biological control. **Biological control**, v. 131, p. 25-35, 2019.
- SILVA, J. S.; FILHO, A. A.; MARTINS, M. F. Avaliação da governança na implementação dos ODS: Levantamento bibliográfico das contribuições teóricas ao tema (2015-2021). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, 2022.

SIQUEIRA, L.M.M. *et al.* Comparação da eficiência entre o fungo *Isaria fumosorosea* e óleo de *Azadirachta indica* sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Anais do Congresso Brasileiro de Fitossanidade**. 2019.

SOARES, Z. T. *et al.* Caracterização e riqueza etnobotânica da família Arecaceae para o Sudoeste Maranhense / Cracaterization and ethnobotanical wealth of the Arecaceae family for the Southwest Maranhense. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.9, p.67274–67289, 2020.

SOUZA, R. F.; KHAN, A. S. Modernização da agricultura e hierarquização dos municípios maranhenses. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 39, n. 1, p. 75-98, 2019.

SOUZA, R. G. *et al.* Efeito do óleo do nim e do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Tenebrio molitor*. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Fitossanidade**. 2019.

SULLIVAN, C.F.; PARKER, B. L.; SKINNER, M. Uma revisão de biopesticidas comerciais à base de *Metarhizium* e *Beauveria* para o controle biológico de carrapatos nos EUA. **Insects**, v. 13, n. 3, p. 260, 2022.

TRIPATHI, A. K. *et al.* Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. **Journal of economic entomology**, v. 93, n. 1, p. 43-47, 2000.

TRONGTOKIT, Y. *et al.* Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

VAN DRIESCHE, R.; BELLOWS, T. S. Controle biológico. **Springer Science & Business Media**, 2012.

VAN LENTEREN, J. C. *et al.* Biological control agents for control of pests in greenhouses. **Integrated pest and disease management in greenhouse crops**, p. 409-439, 2020.

VON NOWAKONSKI, E. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1903 (Hemiptera: Aleyrodidae) e compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros**. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

WANG, Z. Z. *et al.* Parasitoid wasps as effective biological control agents. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 4, p. 705-715, 2019.

WIERMANN, I. S. M. **Metabólitos com atividade inseticida produzidas por fungos entomopatogênicos**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal De São João Del-Rei, Minas Gerais, 2022.

WU, R. A. *et al.* Comparison of the nutritional value of mysore thorn borer (*Anoplophora chinensis*) and mealworm larva (*Tenebrio molitor*): Amino acid, fatty acid, and element profiles. **Food chemistry**, v. 323, p. 126818, 2020.

CAPÍTULO II

PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana* EM LARVAS DE *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos se constituem de um numeroso grupo de organismos que oferecem diversos serviços ecossistêmicos, entre os quais se destaca a capacidade de regular insetos-praga e mantê-los em níveis adequados, sem causar dano econômico. Diversos estudos evidenciam a patogenicidade dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) e *Metarhizium anisopliae* (Metsh) no controle de diversas pragas e, nesse sentido, destaca-se o *Tenebrio molitor* Linneaus (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido como uma praga de grãos armazenados, cuja fase larval é considerada a mais danosa, já que se alimentam mais ativamente, perfurando os grãos, ocasionando perdas significativas de peso e qualidade. Dessa forma, com esta pesquisa objetivou-se determinar as concentrações letais médias (CL_{50}) dos isolados *M. anisopliae* MGSS 192 e *B. bassiana* IBCB 66 sobre o terceiro instar larval de *T. molitor*, avaliando se os isolados demonstram potencial patogênico contra as larvas. A CL_{50} (intervalo de confiança) estimada usando o modelo de concentração-resposta para *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66) foi de 138,61 conídios mL^{-1} (134,51–142,84) e de 155,35 conídios mL^{-1} (149,96–160,93) respectivamente. Os isolados de *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66), foram patogênicos às larvas de *T. molitor*, no entanto, o isolado MGSS 192 se mostrou mais eficaz pois, em menor concentração de conídios/mL, proporcionou 50% de mortalidade nas larvas de terceiro instar.

PALAVRAS-CHAVE: Controle Biológico; Bioinseticidas; Concentração Letal.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi are a large group of organisms that offer diverse ecosystem services, among which the ability to regulate insect pests and maintain them at adequate levels, without causing economic damage, stands out. Several studies demonstrate the pathogenicity of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals) and *Metarhizium anisoplae* (Metsh) in the control of various pests and, in this sense, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) stands out, known as a pest of stored grains, whose larval phase is considered the most harmful, as they feed more actively, piercing the grains, causing significant losses in weight and quality. Therefore, this research aimed to determine the average lethal concentrations (CL's₅₀) of the isolates *M. anisoplae* MGSS 192 and *B. bassiana* IBCB 66 on the third larval instar of *T. molitor*, evaluating whether the isolates demonstrate pathogenic potential against the larvae. The LC₅₀ (confidence interval) estimated using the concentration-response model for *M. anisoplae* (MGSS 192) and *B. bassiana* (IBCB 66) was 138.61 conidia mL⁻¹ (134.51–142.84) and of 155.35 conidia mL⁻¹ (149.96–160.93) respectively. The isolates of *M. anisoplae* (MGSS 192) and *B. bassiana* (IBCB 66) were pathogenic to *T. molitor* larvae, however, the MGSS 192 isolate proved to be more effective because, at a lower concentration of conidia/mL, provided 50% mortality in third instar larvae.

KEY-WORDS: Biological control; Bioinsecticides; Lethal Concentration.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido, no setor agrícola, uma grande procura por produtos biológicos, especialmente dada a importância econômica de algumas pragas agrícolas. De acordo com Fontes e Valadares (2020), em uma área agrícola, quando populações de insetos aumentam em níveis econômicos considerados inaceitáveis e, conseqüentemente, assumem o status de praga, seus inimigos naturais podem ser manejados ou até inseridos para controlá-la. Oliveira *et al.* (2006), também apontam o controle biológico de pragas como uma alternativa sustentável e eficaz ao uso de inseticidas sintéticos, por outro lado, os mesmos autores destacam a possibilidade de uso dos produtos de base biológica concomitantemente aos agroquímicos desde que o pesticida seja seletivo para a praga alvo.

Nesse contexto, Delgado e Ordoñez (2011) evidenciam em seus estudos os fungos entomopatogênicos como um numeroso grupo de organismos que oferecem diversos serviços ecossistêmicos, entre os quais se destaca a capacidade de regular insetos-praga e mantê-los em níveis adequados, sem causar dano econômico. Os primeiros testes com fungos entomopatogênicos, foram realizados pelo russo Metschnikoff no final do século XIX, quando avaliou o potencial de *Metarhizium anisopliae* para o controle de uma espécie de besouro (Farias, 2001). Atualmente, a medida em que os estudos acerca desses organismos se acentuam, o mercado de produtos biológicos apresenta uma crescente no que diz respeito à produção e comercialização destes. Dessa maneira, como destaca Sosa-Gomes (2002), a preservação desses organismos entomopatogênicos é de extrema importância nos estudos sobre controle biológico.

De acordo com Litwin *et al.* (2020), *Bauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* tem sido os entomopatógenos mais estudados nas pesquisas e utilizados nas formulações de produtos comerciais. Von-Nowakowski (2019), também destaca o entomopatógeno *Isaria fumorosea* em seus estudos, em que demonstra eficácia e alta patogenicidade contra a mosca-negra-dos-citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae). Esse potencial é também evidenciado por Tamai *et al.* (2002), onde seus resultados demonstraram que todos os isolados das espécies *Bauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram patogênicos a *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), com valores de mortalidade corrigida aumentando progressivamente com o tempo após a inoculação.

A eficácia já comprovada destes microorganismos se deve ao seu amplo espectro de ação e ainda, como destaca Maninno *et al.* (2019), à forma como este consegue penetrar no

inseto através da cutícula, se espalhando posteriormente pela hemocele. Dessa forma, o fungo é capaz de produzir toxinas dentro do seu hospedeiro, causando paralisia e morte para, posteriormente, colonizar o corpo e produzir esporos em sua superfície (Altinoki *et al.*, 2019).

Nesse sentido, destaca-se o *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) como uma praga de grãos armazenados capaz de causar danos físicos à grandes estoques de grãos tanto em seus cinco instares larvais, quanto em sua fase adulta (Souza; Pinto; Pereira, 2020). A fase larval do inseto é considerada a mais danosa, já que se alimentam mais ativamente, perfurando os grãos, ocasionando perdas significativas de peso e qualidade (Orsolini; Silva, 2018). Além disso, a presença de fezes, fragmentos de ecdises e corpos mortos de insetos também podem contaminar os produtos e a atividade intensa das larvas ocasiona um expressivo aumento de temperatura e umidade nos locais de armazenamento, condições que facilitam a proliferação de outros patógenos (Rumbos *et al.*, 2024).

Ademais, os instares larvais de *T. molitor* vem sendo explorados em estudos de patogenicidade de fungos entomopatógenos, como a pesquisa de Altahawi *et al.* (2020), que confirmou a patogenicidade dos isolados M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 e M9 de *M. anisopliae* nos instares larvais de *T. molitor* (Altahawi *et al.*, 2020).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar as concentrações letais médias (CL₅₀) dos isolados *M. anisopliae* MGSS 192 e *B. bassiana* IBCB 66 sobre o terceiro instar larval de *T. molitor*, avaliando se os isolados demonstram potencial patogênico às larvas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento da criação de *Tenebrio molitor*

A criação foi estabelecida no Laboratório de Entomologia da UEMA, Campus São Luís. Inicialmente, foram adquiridos 2 lotes de 1000 larvas de *T. molitor* na Biofábrica São Luís, localizada no município de São Luís, Maranhão. As larvas foram separadas de acordo com o seu instar de desenvolvimento e, posteriormente, foram transferidas para caixas contendo dieta (farelo de milho + farelo de trigo nas proporções 1/1) esterilizado a uma temperatura de 120°C por 20 minutos em autoclave. Separados os instares, procedeu-se com manutenções periódicas realizadas duas vezes por semana, com o objetivo de obter uma nova geração saudável e numerosa.

2.2 Obtenção de isolados

Nos testes foram utilizados dois fungos: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sendo que para cada um destes utilizou-se um isolado preservado na Micoteca Gilson Soares da Silva – MGSS da Universidade Estadual do Maranhão e duas formulações comerciais (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de fungos entomopatogênicos aplicados em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae).

Patógeno	Marca Comercial	Formulação	Fabricante/Origem
<i>Beauveria bassiana</i>	Boveril® WP PL63	Pó molhável (PM)	Koppert do Brasil Holding Ltda.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Metarril® WP E9	Pó molhável (PM)	Koppert do Brasil Holding Ltda.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MGSS 192	Suspensão concentrada (SC)	Isolado de <i>Tibraca limbativentris</i> (Miranda do Norte - MA)
<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 66	Suspensão concentrada (SC)	IBCB-Instituto Biológico de Campinas, SP.

Para os isolados comerciais, utilizou-se a concentração já estabelecida pelo fabricante e para os isolados IBCB 66 e MGSS 192, cedidos pela MGSS foram estabelecidas cinco concentrações com a realização de pré-testes. Estes últimos, encontravam-se preservados em discos de meio de cultura submersos em água destilada estéril pelo método denominado Castellani e armazenados a uma temperatura de 4°C.

2.3 Repicagem do material biológico

Todos os isolados cedidos pela MGSS foram cultivados separadamente em placas de petri 90x15 mm com meio de cultura BDA (Ágar, Batata, Dextrose) e pentabiótico 0,025% com auxílio de alça de inoculação (Figura 1 A).

O procedimento foi realizado em quadruplicata e as placas já inoculadas foram acondicionadas em câmara tipo BOD com 12 horas de fotoperíodo e temperatura 26°C para incubação, crescimento das estruturas e ativação metabólica do fungo bem como, para confirmação ou descarte de microorganismos contaminantes e posterior definição do processo de purificação por diluição seriada e número de diluições na potência de 10. As placas permaneceram acondicionadas em BOD por sete dias, sendo o crescimento dos fungos avaliado

periodicamente. Confirmando-se o crescimento de estruturas reprodutivas (esporos), foi iniciado o método de purificação por diluição seriada.

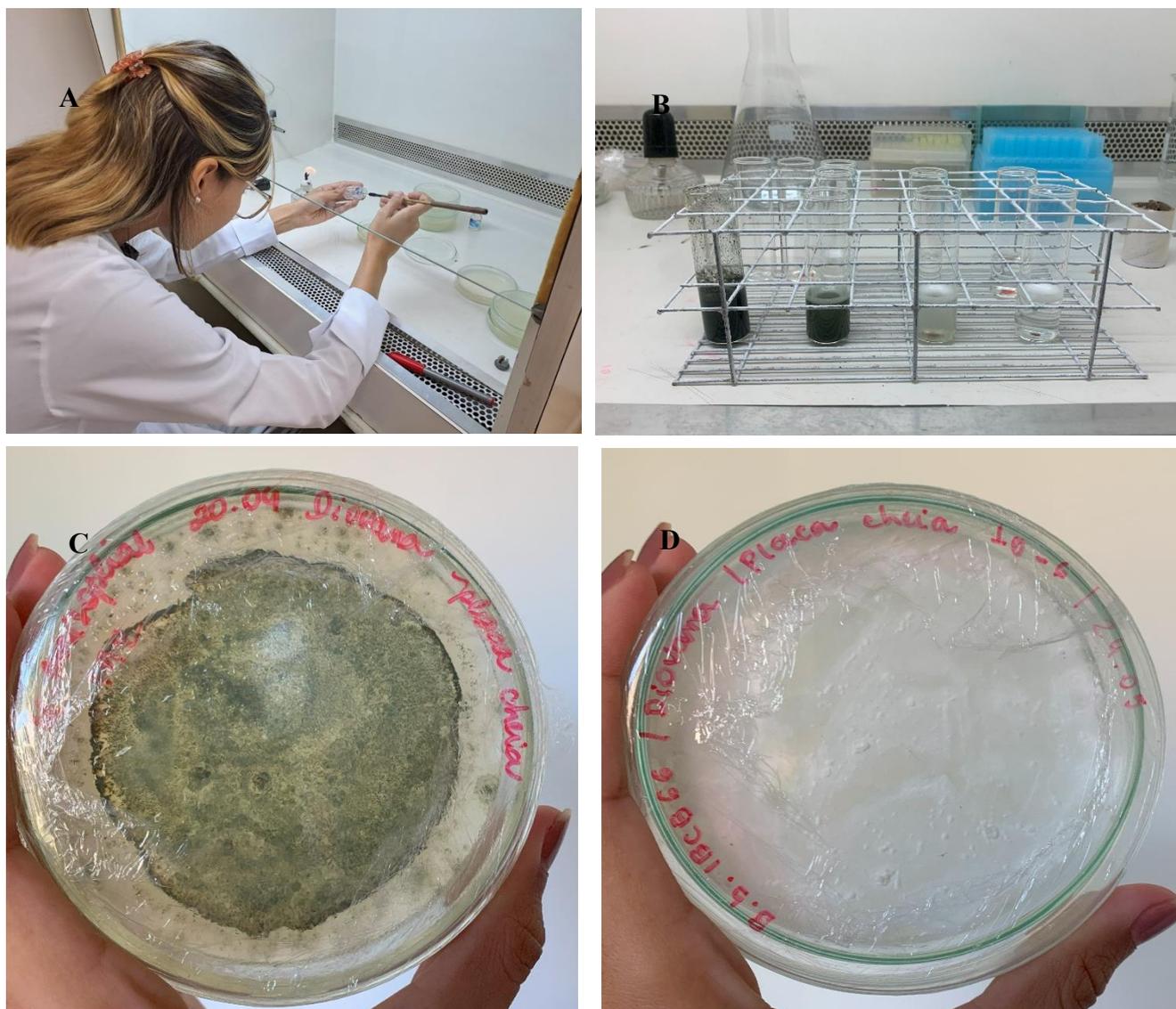


Figura 1. A) Inoculação inicial dos isolados; B) Diluição seriada na potência de 10 para purificação dos isolados; C) Placa cheia *Metarhizium anisopliae* MGSS192; D) Placa cheia *Beauveria bassiana* IBCB 66.

2.4 Purificação dos isolados através da diluição seriada na potência de 10

O método de diluição foi realizado conforme metodologia descrita por Tortora *et al.* (2012). Foi obtida uma amostra original a partir do material fúngico já inoculado anteriormente, que serviu de base para as demais diluições e com auxílio da micropipeta foi transferido 1 mL da amostra original para o primeiro tubo contendo 9mL de água+tween. Esse procedimento foi repetido até o último tubo de forma que, a fonte da amostra para diluição de cada etapa era proveniente da diluição anterior (Figura 1 B). Terminado este processo, foram transferidos 140

microlitros do conteúdo dos tubos com as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} para as placas contendo meio de cultura BDA+pentabiótico 0,025% e espalhado por toda a placa com auxílio da alça de drigalsky. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada diluição e as placas foram acondicionadas por sete dias em câmara BOD, nas mesmas condições já descritas, para crescimento de colônias.

2.5 Preparação do estoque de material fúngico para utilização nos bioensaios

Depois deste período de acondicionamento, com as colônias já crescidas, foi realizada a montagem das placas cheias para compor o estoque fúngico usado nas formulações. Para isto, realizou-se a raspagem de uma colônia por vez e cada uma foi cultivada em uma nova placa, tendo seu conteúdo espalhado com 140 microlitros de água+tween.

As novas placas foram acondicionadas em BOD durante sete dias para crescimento das estruturas reprodutivas. Dessa forma, foi montado um estoque de 35 placas totalmente germinadas de *M. anisopliae* MGSS 192 e *B. bassiana* IBCB 66 que, após o período de acondicionamento, foram utilizadas nas formulações e execução dos bioensaios (Figura 1 C, D).

2.6 Montagem e execução dos bioensaios

Para obter as formulações que seriam pulverizadas nas larvas, o material fúngico foi raspado e procedeu-se com o mesmo método de diluição mencionado anteriormente. Após a diluição foi realizada a quantificação de conídios através da câmara de Neubauer, a média obtida foi utilizada para os cálculos de correção das soluções. Para estabelecimento das cinco concentrações finais, foram realizados pré-testes com concentrações mais baixas como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações obtidas para isolados dos fungos entomopatogênicos da Micoteca MGSS.

Isolados fúngicos	Concentrações iniciais (pré-testes)	Concentrações finais estabelecidas
<i>Metarhizium anisopliae</i> MGSS 192	10^{-6}	10^{-11}
	10^{-7}	10^{-12}
	10^{-8}	10^{-13}
	10^{-9}	10^{-14}
	10^{-10}	10^{-15}
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB 66	10^{-7}	10^{-11}
	10^{-8}	10^{-12}
	10^{-9}	10^{-13}
	10^{-10}	10^{-14}
	10^{-11}	10^{-15}

Para os fungos comerciais Boveril® WP PL63 e Metarril® WP E9 foram seguidas as instruções do fabricante para diluição, tendo suas concentrações já estabelecidas em 2×10^{-9} e $1,39 \times 10^{-8}$ respectivamente e, logo depois, seguiram-se os mesmos passos para as aplicações.

Na etapa de montagem dos testes, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos e sete repetições cada, sendo um tratamento testemunha, em que as larvas foram pulverizadas com água destilada.

Para cada repetição foram utilizadas 10 larvas medindo entre 1,5 e 2,0 cm de comprimento. As aplicações foram realizadas em duplicata utilizando-se Torre de Potter, a uma pressão equivalente a 34 kPa. Para cada concentração, foram pulverizadas um total de 70 larvas que foram divididas em duas placas de Petri, pulverizando-se um volume de 1,7 mL da suspensão fúngica por placa. Após as aplicações, as larvas foram distribuídas em suas unidades experimentais contendo 5g da dieta já mencionada.

Para os dois isolados provenientes da micoteca MGSS, foi realizada também a análise da germinação das estruturas reprodutivas dentro de um intervalo de 15 horas. Para tanto, 140 microlitros das soluções aplicadas nas larvas foram inoculados, separadamente, em placas do tipo Rodak contendo meio de cultura BDA, onde foram marcados cinco pontos para contagem. Após inoculadas, as placas permaneceram em BOD durante 15 horas para posterior contagem de conídios contendo tubos germinativos, considerando a média de 100 conídios por pontos de contagem.

Depois de montados, os bioensaios permaneceram em câmara BOD e, a partir das 24 horas seguintes às aplicações, começaram a ser avaliados diariamente durante um período de dez dias para retirada de larvas mortas e posterior confirmação de mortalidade pelo fungo, através da sequência de procedimentos do Postulado de Kock (Castillo, 2007).

2.7 Isolamento de indivíduos mortos e confirmação de mortalidade pelos fungos

As larvas mortas retiradas durante as avaliações, após passarem por assepsia, foram isoladas em câmaras úmidas montadas em embalagem plástica tipo tubete contendo algodão umedecido em água destilada na tampa onde permaneceram acondicionados em BOD e passaram por avaliações diárias durante os cinco dias seguintes à montagem, para observação de estruturas reprodutivas dos fungos crescendo sobre o corpo da larva. As avaliações foram realizadas visualmente e com auxílio de lupa e, confirmando existência de esporulação sobre a larva, fez-se a raspagem e inoculação das estruturas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+ pentabiótico 0,025% para confirmação do isolado.

Após este isolamento, para efetiva confirmação dos isolados, foram montadas lâminas a partir do conteúdo já crescido na placa para observação dos conídios em microscópio.

2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análises estatísticas no software R (R Core Team, versão 4.4.0, 2024), utilizando o pacote “MASS”. Para os dados obtidos no bioensaio de mortalidade, foi ajustado um modelo concentração-resposta (Probit) e estimadas as concentrações letais (CLs) dos isolados nativos *M. anisopliae* (IBCB 192) e *B. bassiana* (IBCB 66) sobre o terceiro instar de *T. molitor*. Adicionalmente, foi determinado o valor do pseudo- R^2 para os modelos de concentração-resposta testados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos pré-testes realizados com os isolados MGSS 192 e IBCB 66, observou-se mortalidade pouco expressiva das larvas de *T. molitor*, não se adequando ao modelo estatístico. Dessa forma, para os dois isolados, a concentração que causou maior mortalidade foi a de 10^{15} , com um percentual de 71% de mortalidade por *B. bassiana* e 96% por *M. anisopliae*, ou seja, o terceiro instar larval de *T. molitor* possui maior suscetibilidade ao isolado MGSS 192 de *M. anisopliae*. Todos os indivíduos mortos apresentaram esporulação característica dos isolados

(Figura 2), confirmando, mais uma vez, a suscetibilidade aos entomopatógenos. Quanto aos testes realizados com os tratamentos testemunha, não foi observada mortalidade de larvas.

Nos testes com as formulações comerciais não se observou mortalidade de larvas durante os dez dias de avaliação. De acordo com Litwin *et al.* (2020), o sucesso do processo de infecção do hospedeiro envolve uma série de fatores a serem superados, que podem estar ligados, inclusive, ao método de aplicação, ao próprio hospedeiro ou ainda às concentrações do bioproduto. Outro aspecto que pode ser considerado é o fato de que as larvas de *T. molitor*, possuem uma espécie de cutícula rica em quitina e aminoácidos, que podem, de alguma forma impedir a penetração do fungo (Mora, 2015). De acordo com Barnes e Silva (2010), *T. molitor* tem demonstrado uma maior resistência a algumas cepas de entomopatógenos. Vega *et al.*, (2012), sugerem que essa resistência esteja relacionada à melanização cuticular, ou seja, à formação do pigmento melanina por polimerização de compostos fenólicos.



Figura 2: *Metarhizium anisopliae* MGSS 192 e *Beauveria bassiana* IBCB 66 esporulados em larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae).

A partir da variabilidade de indivíduos mortos obtida nas diferentes concentrações, foi possível determinar e comparar as concentrações letais dos isolados. Dessa forma, a hipótese de adequação do modelo foi aceita (MGSS 192: $\chi^2=4,16$; gl=3; p = 0,24; IBCB 66: $\chi^2=2,16$; gl=3; p = 0,54), indicando que o modelo Probit de concentração-resposta é adequado para análise dos resultados do bioensaio de mortalidade do isolado nativo de *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66) sobre o terceiro instar de *T. molitor*. A CL₅₀ (intervalo de

confiança) estimada usando este modelo de concentração-resposta para *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66) foi de 138,61 conídios mL⁻¹ (134,51–142,84) e de 155,35 conídios mL⁻¹ (149,96–160,93) respectivamente (Tabela 3). Os valores do pseudo-R² para *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66) foram de 0,97 e 0,98, respectivamente.

A CL₅₀ ou concentração letal média é uma medida que indica a concentração de uma substância suficiente para diminuir 50% de uma população-alvo (Parra *et al.*, 2001). No caso dos fungos entomopatogênicos, este valor diz respeito à concentração de conídios viáveis, fornecendo uma medida quantitativa da capacidade dos fungos de causarem mortalidade na população de insetos-alvo (Oliveira *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2023).

Gonvidarajan e Benelli (2016), consideram ainda que a determinação da CL₅₀ é uma ferramenta importante na avaliação de riscos associados a resistência da população-alvo, por exemplo e destacam que a concentração letal média pode ser eficaz no desenvolvimento de estratégias mais efetivas, sustentáveis e seguras para o controle de pragas, ajudando também a determinar os níveis de exposição que podem representar risco aos indivíduos não alvo (Martínez *et al.*, 2023). Ao comparar as CL₅₀ obtidas nos isolados, percebe-se que o isolado MGSS 192, apresentou maior eficácia no controle das larvas do que o isolado IBCB 66, causando mortalidade em metade da população com uma menor concentração de conídios/mL.

Tabela 3. Concentrações letais (CLs) (conídios/mL) dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para *Tenebrio molitor* estimadas com base em bioensaios de concentração/mortalidade.

Isolados fúngicos	CLs	conídios/mL (IC)
<i>Metarhizium anisopliae</i> MGSS 192		
$\chi^2=4,16$; gl=3; p = 0,24	CL ₁₀	108,04 (102,10-114,34)
	CL ₂₅	121,58 (116,80-126,55)
	CL ₅₀	138,61 (134,51-142,83)
	CL ₈₀	163,24 (156,84-169,91)
	CL ₉₀	177,82 (168,87-187,24)
	CL ₉₉	217,86 (200,25-237,02)
<i>Beauveria bassiana</i> IBCB 66		
$\chi^2=2,16$; gl=3; p = 0,54	CL ₁₀	116,09 (109,37-123,23)
	CL ₂₅	133,27 (127,98-138,77)
	CL ₅₀	155,35 (149,96-160,93)
	CL ₈₀	188,09 (177,53-179,28)
	CL ₉₀	207,87 (192,91-223,98)
	CL ₉₉	263,58 (234,15-297,71)

*IC – Intervalo de confiança

Atrelado a isto, no teste de viabilidade, os conídios dos dois isolados demonstraram-se viáveis, uma vez que, considerando a média por ponto de contagem, 100% dos conídios encontravam-se com suas estruturas reprodutivas bem desenvolvidas após 15 horas de inoculação. Pouquíssimos trabalhos exploram o potencial de controle de entomopatógenos por bioprospecção em larvas de *T. molitor*, no entanto, estudos como o de Shah *et al.* (2023), confirmam a eficácia do entomopatógeno *M. anisopliae* em larvas de *T. molitor*, infectando os insetos através da cutícula, que é degradada pelo crescimento e esporulação do fungo. O sucesso do controle com entomopatógenos pode estar relacionado com as condições ambientais como temperatura e umidade, além disso, sua eficácia pode variar dependendo da concentração do fungo ou da cepa específica (Alves *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2022).

Adatia *et al.* (2010), também comprovaram 50% de mortalidade em larvas de *T. molitor* quando submetidos a dois isolados de *M. anisopliae* durante um período de avaliação de sete dias. Os mesmos autores também compararam o modo de ação de uma cepa já comercializada com os isolados em teste e constataram igual eficácia. Por este viés, é importante destacar que a eficácia ou não de um produto comercial testado depende diretamente dos insetos-praga para os quais este é recomendado. Erler e Ates (2015), também testaram o potencial de controle de formulações comerciais de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em estágios larvais de Coleópteros, analisando que as larvas em estágios mais jovens (1º e 2º instar), foram suscetíveis a ação dos fungos, do que larvas de terceiro instar, sendo que as taxas de mortalidade entre os três instares, variou de acordo com a concentração de conídios em ambos os fungos.

Em seus estudos, Rodrigues *et al.* (2009) verificaram a virulência de dois isolados de *B. bassiana* na fase larval e em insetos adultos de *T. molitor*. Dessa forma, observaram mortalidade superior a 90% nos insetos adultos após seis dias de avaliação e uma porcentagem de 80% de mortalidade em larvas após onze dias de avaliação. Batta *et al.* (2010), investigaram a eficácia de *B. bassiana* em larvas de terceiro e quarto instar também constatando mortalidade superior a 85%. Este fungo teve ainda sua atividade biológica estudada por Rice e Cogburn (1999) que verificaram sua patogenicidade contra três coleópteros considerados pragas de grãos armazenados, constatando mortalidade de 80% a 100% nas dosagens mais altas do fungo 21 dias após o tratamento. No mesmo estudo constatou-se ainda uma redução de até 99% da progênie de insetos adultos em grãos armazenados, demonstrando a eficácia do tratamento com o fungo.

Os resultados obtidos por Barci *et al.* (2009), permitiram verificar que, nas concentrações entre 5×10^6 a 10^9 conídios mL⁻¹, o isolado IBCB 66 de *B. bassiana* apresenta potencial patogênico para controlar larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. Entretanto, apenas concentrações iguais ou superiores a 5×10^8 conídios mL⁻¹, que promoveram 83% de mortalidade de larvas, mostraram eficácia necessária para possível utilização a campo.

Valente *et al.* (2014), avaliaram o potencial patogênico dos isolados URPE-11 e E-9 de *M. anisopliae* e ESALQ 447 de *B. bassiana*, constatando que os isolados mostraram-se patogênicos a *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae). Além disso, os autores observaram viabilidade dos conídios superior a 96% nos isolados testados e determinaram a CL50 para o isolado URPE-11, diante da elevada infecção ocasionada por este isolado nas diferentes idades dos ovos, causando 100% de infecção. Dessa forma, determinou-se a CL50 estimada em $2,0 \times 10^5$ com limites inferior e superior de $1,5 \times 10^5 - 2,8 \times 10^5$, respectivamente ($\chi^2 = 6,05$; $P = 0,1094$). O resultado obtido com relação a CL50 para o isolado URPE-11 de *M. anisopliae* sugere elevada virulência do mesmo sobre ovos de *D. flavipennella*.

Araújo (2008), determinou as CL's 50 dos isolados CG30 de *M. anisopliae* e CG001 de *B. bassiana* para o controle de pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae), chegando à concentração de $1,6 \times 10^6$ conídios/mL para o isolado de *B. bassiana* e $3,4 \times 10^6$ para o isolado de *M. anisopliae*. Além disso, os mesmos autores constataram mortalidade de 64% de insetos causada pelo isolado CG30 que foi mais patogênico.

4 CONCLUSÕES

- As formulações comerciais testadas não causaram mortalidade efetiva no terceiro instar larval de *T. molitor*;
- Os isolados de *M. anisopliae* (MGSS 192) e *B. bassiana* (IBCB 66), foram patogênicos às larvas de *T. molitor*;
- O isolado MGSS 192 de *M. anisopliae* em menor concentração de conídios/mL proporcionou 50% de mortalidade nas larvas de terceiro instar.

REFERÊNCIAS

- ADATIA, A. *et al.* Pathogenicity of two new isolates of *Metarhizium anisopliae* from Canadian soil to *Melanoplus bivittatus* (Orthoptera: Acrididae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **The Canadian Entomologist**, v. 142, n. 2, p. 128-134, 2010.
- ALMEIDA, G. D. *et al.* Determinação da concentração letal média (CL 50) de *Beauveria bassiana* para controle de *Brevicoryne brassicae*. **Idesia (Chile)**, v. 25, n.2, 2007.
- ALTINOK, H. H. *et al.* Modes of action of entomopathogenic fungi. **Current Trends in Natural Sciences**, v. 8, n. 16, p. 117-124, 2019.
- ALVES, R. T. *et al.* Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. **EMBRAPA CERRADO**. 1998.
- COSME, L. V. *et al.* Toxicidade de óleo de nim para pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Arquivos de Instituto Biológico**. São Paulo, v.76, n.2, p.233-238, 2009.
- DELGADO, P. A. M.; MURCIA-ORDOÑEZ, B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. **Revista Ambiente & Água**, v. 6, n. 2, p.77-90, 2011.
- FONTES, E. M. G.; VALADARES, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília: **Embrapa**, 2020.
- GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. One-pot green synthesis of silver nanocrystals using *Hymenodictyon orixense*: a cheap and effective tool against malaria, chikungunya and Japanese encephalitis mosquito vectors. **RSC advances**, v. 6, n. 64, p. 59021-59029, 2016.
- HONG, J.; HAN, T.; KIM, Y. Y. Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: A review. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2068, 2020.
- LIMA, L. M. R. ***Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Planococcus* sp. na cultura do cafeeiro em condições de campo**. 2021. Monografia (Graduação) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, 2021.
- LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 19, p.23-42, 2020.
- LÓPEZ, M. A. C.; OSORIO, J. W. M. Compatibility of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with *Chrysoperla externa* depredator of *Trialeurodes vaporariorum*. **Chilean journal of agricultural & animal sciences**, v. 35, n. 1, p. 38-48, 2019.
- MANNINO, M. C. *et al.* Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 33, 2019.
- MARTÍNEZ, J. A. R. *et al.* Evaluation of the pathogenicity of entomopathogenic fungi isolated from the larvae of the corn stem borer *Diatraea grandiosella* Dyar (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 189-199, 2023.
- MORA, M. A. E. **Fungos entomopatogênicos isolados de solos de um fragmento de mata atlântica**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em fitossanidade e biotecnologia aplicada. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2015.

MORAES, S. C. S. *et al.* Avaliação de patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em formigas do gênero *Atta* spp. utilizando aprendizado de máquina. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2022.

NASCIMENTO, M. O. do. Interação entre fungos de solos e a formiga-cortadeira *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal - PPGPV. 2015.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Controle biológico de pragas em cultivos comerciais como alternativa ao uso de agrotóxicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.1, n.2, p.1, 2006.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Oligonychus yotheresi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 347-351, 2004.

ORSOLIN, D. C; SILVA, M. A. T. DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM CONDIÇÃO DE LABORATÓRIO. SEPE-Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS, v. 8, 2018.

PARRA, A. L. *et al.* Estudo comparativo do ensaio de *Artemia salina* L. e da estimativa da dose letal média (LD50) em camundongos, para determinação da toxicidade aguda oral de extratos vegetais. **Fitomedicina**, v. 8, n. 5, p.395-400, 2001.

RODRÍGUEZ, G. D. *et al.* Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 513-518, 2009.

SHAH, S. *et al.* Resporulation of *Metarhizium anisopliae* granules on soil and mortality of *Tenebrio molitor*: Implications for wireworm management in sweetpotato. **Annals of Applied Biology**, v. 182, n. 1, p. 65-76, 2023.

SOSA-GOMEZ, D. R. Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados. Londrina, **Embrapa Soja**, 2002. v. 1. Série documentos.

SOUZA, T. D.; PINTO, A. A.; PEREIRA, R. C. Biodegradação de polietileno de alta densidade (PEAD) por meio de larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Agrotecnologia-Agrotec**, v. 11, n. 2, p. 57-64, 2020.

TAMAI, M. A. *et al.* Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 77-84, 2002.

ULHOA, L. A. *et al.* Virulência de fungos entomopatogênicos a *Enneothrips flavens* (Thysanoptera: Thripidae). **South American Sciences**. v. 1, n. 2, p. e2094-e2094, 2020.

VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeasts as insect endosymbionts. **Insect e Fungal Associations: Ecology and Evolution**, New York: Oxford University Press, 2005, p. 211-24.

VON NOWAKONSKI, E. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a mosca-negrados-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1903 (Hemiptera: Aleyrodidae) e compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros.** Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

CAPÍTULO III

**ANÁLISE DE COMPATIBILIDADE DOS ÓLEOS VEGETAIS DE NIM E ALGODÃO
COM O ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*, ISOLADO MGSS 192**

RESUMO

O uso de óleos vegetais na agricultura tem ganhado destaque como uma alternativa sustentável e eficaz no controle de pragas e doenças, incluindo o manejo biológico, uma vez que vem sendo explorados como adjuvantes de fungos entomopatogênicos, potencializando a ação patogênica desses organismos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e determinar os níveis de compatibilidade do óleo de nim da marca comercial Fitoneem[®] (Concentração do i.a. 1,2 g/L) e do óleo fixo de algodão sobre o isolado MGSS 192 de *Metarhizium anisopliae*. Para atingir o objetivo proposto foram avaliados os parâmetros de diâmetro das colônias, número e viabilidade de conídios. Os dados resultantes do diâmetro das colônias demonstraram uma crescente taxa de crescimento do fungo com o aumento dos dias de exposição aos óleos e concentrações testadas. Na quantificação de conídios, a maior média (erro padrão) foi representada pelo tratamento com óleo de nim a 2% ($2215,500 \pm 77,41821$), comparada ao tratamento controle que obteve a pior média, correspondendo a $631,583 \pm 23,75943$, enquanto nos tratamentos com óleo fixo de algodão apresentaram médias inferiores ao tratamento controle, sendo a menor média observada no tratamento em que foi testada a concentração 5% ($11,62 \pm 1,05$). Para viabilidade, o óleo fixo de algodão apresentou baixa viabilidade de conídios nas concentrações 4% e 5%, ao contrário, nos tratamentos com óleo de nim, houve alta viabilidade em todas as concentrações testadas. Dessa forma, no cálculo do valor de T, o óleo fixo de algodão demonstrou-se muito tóxico ao isolado MGSS 192 nas concentrações 4% e 5% enquanto nos tratamentos com óleo de nim, não foi verificada toxicidade.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Inseticidas botânicos; Interação; Toxicidade.

ABSTRACT

The use of vegetable oils in agriculture has gained prominence as a sustainable and effective alternative for pest and disease control, including biological management, as they are being explored as adjuvants for entomopathogenic fungi, enhancing the pathogenic action of these organisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate and determine the levels of compatibility of neem oil of the commercial Fitoneem® (concentration of a.i. 1.2 g/L) and of fixed cotton oil on the MGSS 192 isolate of *Metarhizium anisopliae*. To achieve the proposed objective, parameters such as colony diameter, number, and viability of conidia were evaluated. The resulting data on colony diameter demonstrated an increasing growth rate of the fungus with the increased days of exposure to the oils and tested concentrations. In the quantification of conidia, the highest mean (standard error) was represented by the treatment with neem oil at 2% (2215.500 ± 77.41821), compared to the control treatment, which had the lowest mean, corresponding to 631.583 ± 23.75943 , while the treatments with fixed cotton oil showed lower means than the control treatment, with the lowest mean observed in the treatment with a 5% concentration (11.62 ± 1.05). For viability, fixed cotton oil showed low conidia viability at 4% and 5% concentrations; on the contrary, in the treatments with neem oil, high viability was observed at all tested concentrations. Thus, in the calculation of the T value, fixed cotton oil was found to be very toxic to the MGSS 192 isolate at 4% and 5% concentrations, whereas no toxicity was observed in the neem oil treatments.

Keywords: Entomopathogenic fungi; Botanical insecticides; Interaction; Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O uso de óleos vegetais na agricultura tem ganhado destaque como uma alternativa sustentável e eficaz no controle de pragas e doenças, incluindo o manejo biológico, através do uso em conjunto com fungos entomopatogênicos (Campolo *et al.*, 2018; Chaudhare *et al.*, 2021; Halder, Divekar e Hani, 2021). Nesse sentido, destacam-se os entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, fungos que são utilizados por sua capacidade de infectar e matar insetos-praga. A compatibilidade entre óleos vegetais e esses fungos é um aspecto importante para garantir a eficácia do controle biológico integrado (Rehman *et al.*, 2020).

Segundo Machado e Pimentel (2021), a compatibilidade entre óleos vegetais e fungos entomopatogênicos representa uma importante ferramenta para manter a viabilidade e o potencializar a ação dos fungos quando aplicados junto aos óleos. Estudos mostram que alguns óleos vegetais podem servir como carreadores ou adjuvantes para os fungos, aumentando a adesão e penetração nas cutículas dos insetos-praga (Ali *et al.*, 2018; Rehman *et al.* 2020). No entanto, a escolha do óleo adequado é crucial, uma vez que alguns óleos podem ser tóxicos para os fungos ou reduzir sua eficácia (Barbosa, 2019).

O nível de compatibilidade entre óleos vegetais e fungos entomopatogênicos pode variar significativamente. O óleo de nim, por exemplo, tem demonstrado alta compatibilidade com fungos como *B. bassiana*, promovendo a esporulação e infecção dos fungos enquanto oferece propriedades repelentes adicionais contra insetos-praga (Potrich *et al.*, 2018; Wisuda, Harjaka e Prasetyaningrum, 2019; Saikia *et al.*, 2023).

De acordo com Khun *et al.* (2021), existe um índice que determina o nível de compatibilidade onde valores de 0 a 41 representam toxicidade, de 42 a 66 indicam toxicidade moderada e valores maiores que 66 correspondem à compatibilidade. Nesse sentido, Saikia *et al.* (2023), avaliou a compatibilidade entre *B. bassiana* e os óleos vegetais de nim (*Azadirachta indica*), laranja (*Citrus Sinensis Osbeck* – Rutaceae), citronela (*Cymbopogon nardus*) e pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*), considerando os parâmetros de tamanho das colônias, produção de conídios, esporulação e cálculo de toxicidade, constatando diferentes níveis de compatibilidade em todos os óleos testados, exceto nos tratamentos com óleo de pinhão-manso que apresentou toxicidade moderada, afetando a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*.

Portanto, a escolha do óleo vegetal apropriado e a determinação de suas concentrações ideais são fatores fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficazes e sustentáveis no controle de pragas. Além disso, pesquisas adicionais são necessárias para aprofundar o

entendimento sobre as interações entre diferentes óleos vegetais e fungos entomopatogênicos, visando otimizar as práticas de manejo integrado de pragas e promover a sustentabilidade agrícola (Sohrabi *et al.*, 2019). Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar e determinar os níveis de compatibilidade dos óleos de nim e o de algodão sobre o isolado MGSS 192 de *M. anisopliae*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises de compatibilidade foram realizadas no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão. Foram utilizados o óleo de nim da marca comercial Fitoneem® (Concentração do i.a. 1,2 g/L) e o óleo fixo de Algodão e, para cada um deles foram testadas cinco concentrações: 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. Os procedimentos metodológicos foram divididos em três etapas principais adaptadas à metodologia descrita por Saikia *et al.* (2023).

2.1 Incorporação dos óleos e inoculação do fungo

Para obtenção dos tratamentos, cada óleo foi diluído em 500 mL de meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar) tratado com pentabiótico a 0,025%; a diluição foi realizada em proporções de acordo com a concentração estabelecida (Tabela 1). O meio de cultura foi derretido em forno micro-ondas e, após passar por um breve resfriamento de 10 minutos, os óleos foram incorporados em suas respectivas quantidades e os tratamentos foram vertidos em placas de Petri nas dimensões 90cm x 15cm na câmara de fluxo laminar. Vertidas, as placas permaneceram abertas por 20 minutos para total solidificação do meio tratado.

Tabela 1. Proporção da diluição dos óleos vegetais de nim e algodão para os testes de compatibilidade.

Concentração (%)	Quantidade de meio BDA (mL)	Quantidade de óleo incorporada ao meio (mL)
1%	500 mL	1 mL
2%	500 mL	2 mL
3%	500 mL	3 mL
4%	500 mL	4 mL
5%	500 mL	5 mL

Após a solidificação, com auxílio de uma alça de cobre recortou-se pequenos círculos de meio de cultura em uma placa previamente cultivada com *M. anisopliae* isolado MGSS 192. Os pontos recortados foram inoculados no centro das placas contendo os tratamentos de modo

que o fungo ficou em contato com o meio tratado. As placas inoculadas foram identificadas, vedadas em plástico filme e mantidas em câmara BOD a uma temperatura de 25°C.

2.2 Diâmetro das colônias

Após três dias de incubação, iniciou-se a medição do diâmetro das colônias com auxílio de paquímetro. As medições foram realizadas até que as primeiras colônias atingissem o diâmetro máximo de 9cm x 9cm, dessa forma, foi possível obter o diâmetro médio das colônias após seis dias de incubação em câmara BOD.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e 10 repetições para o óleo fixo de algodão (1-5%) ou óleo de nim (1-5%), respectivamente. Os dados foram analisados previamente pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos resíduos e pelo teste de Hartley para testar a homogeneidade das variâncias. No entanto, os dados não atenderam aos pressupostos das análises paramétricas sendo necessário utilizar o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), não-paramétrico, para comparar os tratamentos entre si. As análises estatísticas foram conduzidas no programa Statistica 12.0 (StatSoft Inc., versão 12.0, Tulsa, USA)

2.3 Quantificação e análise de viabilidade de conídios

Foram escolhidas, aleatoriamente, três colônias de cada tratamento que tiveram seu conteúdo raspado e diluído em 10 mL de água + espalhante adesivo Tween 80 a 0,05%, com o auxílio de aparelho vórtex. Devidamente homogeneizada, uma alíquota desta diluição foi colocada em câmara de Neubauer para quantificação dos conídios.

Após a contagem, as soluções obtidas foram ajustadas para que se obtivesse a concentração de 10^6 conídios/mL que teve uma alíquota do seu conteúdo inoculada em placas do tipo Rodak e incubadas em BOD por 15 horas. Após esse período, foi determinada a viabilidade de conídios através da contagem e observação do crescimento de suas estruturas reprodutivas, considerando um número máximo de 100 conídios por repetição (campo de contagem).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) tanto para o teste de quantificação, quanto para viabilidade. Os tratamentos para o teste de viabilidade foram compostos pelo controle (n=30), óleo fixo de algodão (1-5%) (n=30) ou óleo de nim (1-5%) (n=30), enquanto para quantificação dos conídios, os tratamentos foram compostos pelo

controle (n=24), óleo fixo de algodão (1-5%) (n=24) ou óleo de nim (1-5%) (n=24). Os dados foram analisados previamente pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos resíduos e pelo teste de Hartley para testar a homogeneidade das variâncias. No entanto, os dados não atenderam aos pressupostos das análises paramétricas sendo necessário utilizar o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) para identificar diferenças significativas entre tratamentos. Em seguida, procedeu-se com o teste de comparações múltiplas de Dunn (pacote `dunn.test`) para comparar os tratamentos entre si. Os gráficos de box-plot foram gerados por meio do pacote `ggplot2`. As análises estatísticas foram conduzidas no programa R (R Core Team, 2024; versão 4.4.1).

2.4 Determinação da compatibilidade ou toxicidade dos produtos

Para esta determinação, foi considerada a relação entre os valores de crescimento vegetativo (CV) e esporulação (ESP) com o controle, baseando-se na fórmula proposta por Alves *et al.* (1998) que busca determinar o fator T em que, $T = [20 (CV) + 80 (ESP)] / 100$, considerando as classificações do valor de T (Tabela 2).

Tabela 2. Classificações para o valor do valor de T (Toxicidade) (Alves et al., 1998).

Nível de toxicidade / Compatibilidade	Valores de T
Muito tóxico	0 – 30
Tóxico	31 – 45
Moderadamente tóxico	46 – 60
Compatível	Acima de 60

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Diâmetro das colônias

O crescimento das colônias se iniciou três dias após inoculação (DAI) e foi avaliado até o sexto dia, período em que as colônias começaram a atingir o diâmetro máximo de crescimento na placa. A partir dos dados obtidos para os tratamentos com óleo fixo de algodão, observou-se que, no primeiro dia de avaliação ($H=38,08$, $\chi^2=26,40$, $gl=5$, $n= 60$, $p < 0,0001$), os tratamentos com as concentrações 1% e 2% apresentaram a menor média (cm) do crescimento das colônias de *M. anisopliae* MGSS 192 quando comparados ao controle, apresentando média equivalente a $2,69 \pm 0,24$ e $2,44 \pm 0,18$, respectivamente. No segundo dia de avaliação ($H=16,50$, $\chi^2=12,35$, $gl=5$, $n= 60$, $p < 0,05$), a concentração de 1% manteve-se com a menor média,

apresentando valores de $4,85 \pm 0,20$. Em contrapartida, não houve diferença no diâmetro (cm) do isolado MGSS 192 entre os tratamentos no terceiro dia de avaliação ($H=7,75, \chi^2=6,96, gl=5, n=60, p>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do óleo fixo de algodão (%) no diâmetro (cm) do isolado MGSS 192 em laboratório.

Tratamentos	Diâmetro (cm) do isolado MGSS 192		
	1º dia (média±EP ¹) (n ²)	2º dia (média±EP ¹) (n ²)	3º dia (média±EP ¹) (n ²)
Controle	5,66±0,36a (n=10)	6,73±0,40a (n=10)	7,40±0,43a (n=10)
Óleo fixo de algodão (1%)	2,69±0,24b (n=10)	4,85±0,20b (n=10)	7,32±0,39a (n=10)
Óleo fixo de algodão (2%)	2,44±0,18b (n=10)	5,96±0,34a (n=10)	8,16±0,38a (n=10)
Óleo fixo de algodão (3%)	4,82±0,35a (n=10)	6,26±0,24a (n=10)	7,80±0,27a (n=10)
Óleo fixo de algodão (4%)	4,48±0,21a (n=10)	5,99±0,32a (n=10)	7,62±0,36a (n=10)
Óleo fixo de algodão (5%)	4,65±0,33a (n=10)	6,69±0,38a (n=10)	8,38±0,19a (n=10)

Já nos tratamentos com óleo de nim, verificou-se que a concentração de 4% apresentou melhor média no primeiro dia de avaliação ($H=24,54, \chi^2=18,40, gl=5, n=60, p<0,001$), correspondendo a $6,86 \pm 0,51$, enquanto os tratamentos com as concentrações 1% e 5%, apresentaram média abaixo do esperado ($3,49 \pm 0,42$ e $4,33 \pm 0,39$, respectivamente) se comparado à testemunha. Para o segundo dia 2º dia ($H=17,83, \chi^2=13,54, gl=5, n=60, p<0,05$), as colônias de MGSS 192 inoculadas na concentração de 4% de óleo de nim, mantiveram-se com melhor média ($7,37 \pm 0,48$), juntamente com as colônias tratadas com nim a 2% ($7,55 \pm 0,47$). Por outro lado, não houve diferença no diâmetro (cm) do isolado MGSS 192 entre os tratamentos no terceiro dia de avaliação ($H=13,06, \chi^2=14,20, gl=5, n=60, p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito do óleo de nim (%) no diâmetro (cm) do isolado MGSS 192 em laboratório.

Tratamentos	Diâmetro (cm) do isolado MGSS 192		
	1º dia (média±EP ¹) (n ²)	2º dia (média±EP ¹) (n ²)	3º dia (média±EP ¹) (n ²)
Controle	5,66±0,36ab (n=10)	6,73±0,40ab (n=10)	7,40±0,43a (n=10)
Óleo de nim (1%)	3,49±0,42b (n=10)	4,99±0,39b (n=10)	6,21±0,40a (n=10)
Óleo de nim (2%)	6,47±0,45ab (n=10)	7,55±0,47a (n=10)	8,17±0,34a (n=10)
Óleo de nim (3%)	5,03±0,49ab (n=10)	5,95±0,54ab (n=10)	6,64±0,54a (n=10)
Óleo de nim (4%)	6,86±0,51a (n=10)	7,37±0,48a (n=10)	7,75±0,42a (n=10)
Óleo de nim (5%)	4,33±0,39b (n=10)	5,53±0,55ab (n=10)	6,33±0,54a (n=10)

Em todos os tratamentos foi possível ainda observar que os dados registrados mostraram a crescente taxa de crescimento do fungo com o aumento dos dias de exposição aos óleos e concentrações testadas, demonstrando que, apesar das diferenças nas médias obtidas, as concentrações testadas nos dois produtos não inibiram o crescimento fúngico de MGSS 192.

Saikiaa *et al.* (2023), acompanharam o crescimento do isolado KR55715 de *Beuveria bassiana*, inoculado em meio de cultura tratado com 2%, 1% e 0.5% de óleo de nim, constatando que, durante o período de avaliação, o maior crescimento fúngico foi notado nos tratamentos com a menor concentração testada (0,5%). O crescimento de *B.bassiana* quando exposto ao óleo de nim foi registrado em três concentrações diferentes e registrou o maior crescimento (58,40 mm) no 14º DAI contra 0,50 por cento seguido por 48,60 mm e 41,20 mm em concentrações de 1,00 e 2,00 por cento, respectivamente. Ao comparar estes resultados, pode-se inferir que, apesar de melhores resultados terem sido observados na menor concentração de óleo de nim, as colônias precisaram de um período maior para atingirem seu diâmetro médio.

Os estudos de Raypuriya, Das e Bhowmick (2019), revelaram que as diferenças no crescimento de *M. anisopliae* em meio tratado com óleo de nim a 0,5% e 0,1% foram significativas, registrando medida máxima de 71,67 mm em ambas as concentrações e demonstrando que o óleo testado não inibiu o crescimento do isolado. Por outro lado, Carvalho *et al.* (2023), avaliou a compatibilidade dos óleos de tomilho *Thymus vulgaris* L. e capim limão *Cymbopogon citratus*, quanto a sua compatibilidade com um isolado de *B. bassiana* e notaram, pelos resultados apresentados, incompatibilidade com o entomopatógeno, ocorrendo um efeito antifúngico nas concentrações testadas e causando a morte do fungo já nos primeiros dias de incubação.

Nos tratamentos com óleo de algodão a 4% e 5% foi possível observar que, mesmo no terceiro dia de avaliação, o crescimento predominante nas repetições era micelial (Figura 1). O crescimento micelial de um isolado fúngico, refere-se à massa de hifas ramificadas que compõem o corpo vegetativo do fungo; este tipo de crescimento envolve a extensão e ramificação das hifas, que se espalham pelo substrato ou meio de cultura, formando colônias. Em contrapartida, os fungos apresentam ainda o crescimento esporulativo, que diz respeito à formação das estruturas reprodutivas, cruciais para dispersão e sobrevivência do patógeno e, conseqüentemente para seu efetivo potencial patogênico (Botelho; Monteiro, 2011; Alves *et al.*, 2019; Saldanha *et al.*, 2022).



Figura 1. Crescimento de *M. anisopliae* MGSS 192 predominantemente micelial quando exposto às concentrações 4% e 5% de óleo fixo de algodão.

3.2 Quantificação de conídios

Os resultados mostraram que o óleo de nim, em todas as concentrações testadas, favoreceu o crescimento das estruturas fúngicas de *M. anisopliae* MGSS 192, como evidenciado pela maior média de quantificação de conídios nos tratamentos com nim em comparação com o controle. A concentração de 2% de óleo de nim destacou-se com a maior produção de conídios ($2215,500 \pm 77,41821$), indicando uma ação estimulante em potencial do óleo de nim no desenvolvimento fúngico. A diferença significativa observada ($H= 119,84$, $gl = 5$, $n=144$, $p\text{-value} < 0,05$) reforça a ideia de que o óleo de nim não só é compatível, mas também

pode promover a esporulação de *M. anisopliae*, o que é vantajoso para o uso combinado no manejo integrado de pragas.

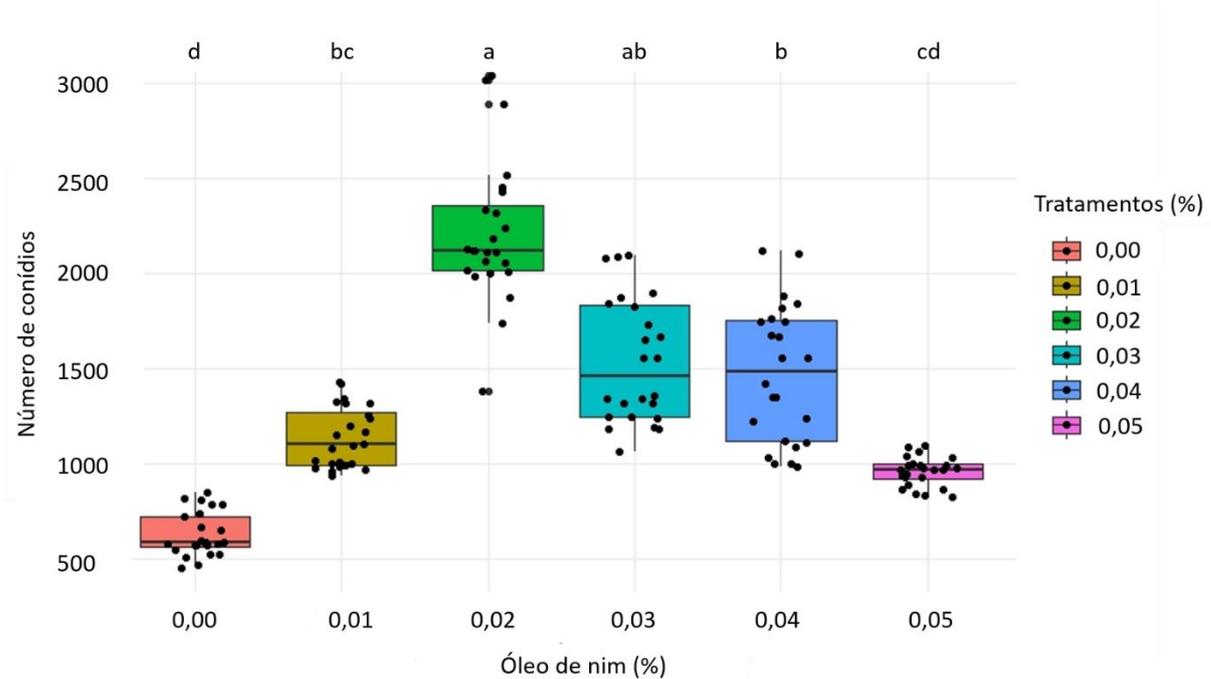


Figura 2. Média obtida a partir da quantificação de conídios obtida nos tratamentos com óleo de nim (1% a 5%).

Um dos principais compostos ativos do óleo de nim é a azadiractina, conhecida por suas propriedades inseticidas. Além de seu efeito direto sobre insetos, a azadiractina pode influenciar o metabolismo dos fungos de maneira benéfica, possivelmente estimulando o crescimento e a esporulação. É possível que esse composto atue como um promotor de vias metabólicas que favoreçam a proliferação de conídios em *M. anisopliae*. A azadiractina pode também modular a produção de enzimas essenciais para o desenvolvimento fúngico, aumentando a eficiência do processo de esporulação (Ataíde *et al.*, 2025; Lima, 2022)

Em contraste, o óleo fixo de algodão apresentou um efeito inibitório significativo na formação de esporos de *M. anisopliae* MGSS 192. Todos os tratamentos com óleo de algodão resultaram em médias de quantificação de conídios inferiores ao controle, sendo a concentração de 5% a mais prejudicial, com a menor média registrada ($11,62 \pm 1,05$). Esses dados indicam que o óleo fixo de algodão, especialmente em concentrações mais altas, pode inibir o desenvolvimento fúngico, o que torna sua utilização limitada em formulações que dependem da esporulação fúngica para o controle eficaz de pragas (Figura 3).

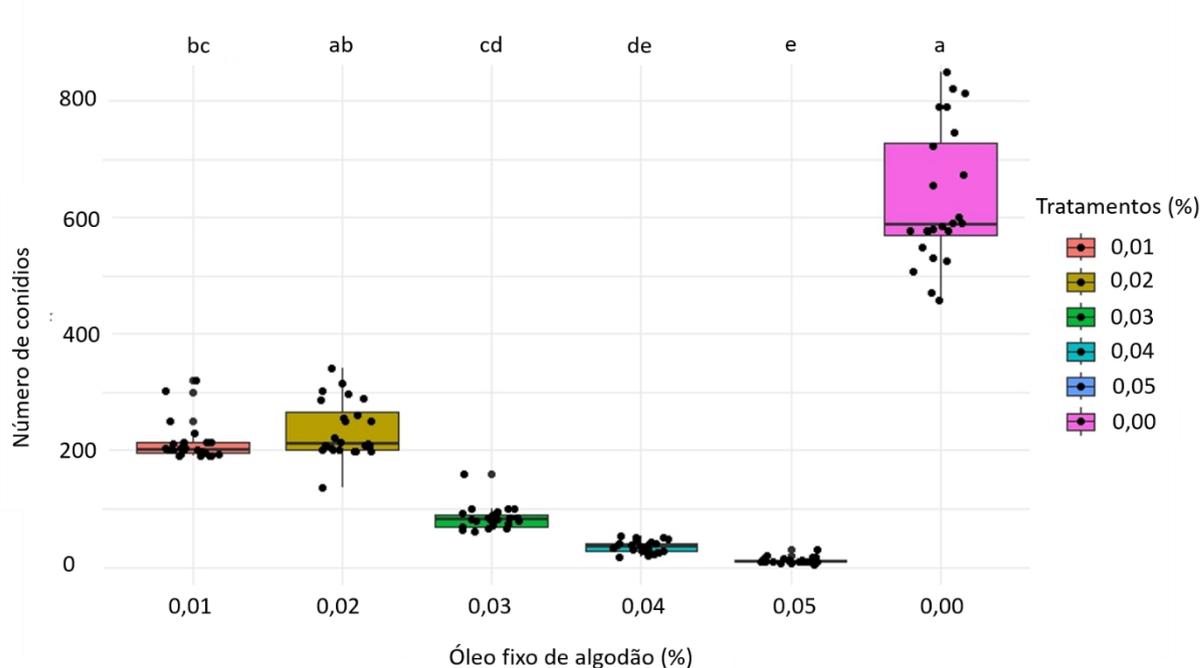


Figura 3. Médias obtidas a partir da quantificação de conídios nos tratamentos com óleo fixo de algodão (1% a 5%).

O óleo de algodão é rico em ácidos graxos, como ácido linoleico e ácido oleico, que podem exercer efeitos antagônicos sobre o desenvolvimento de *M. anisopliae*. Esses compostos podem interferir na integridade das membranas celulares do fungo, perturbando o seu crescimento normal e levando à inibição da formação de conídios. Além disso, o óleo de algodão pode conter outros compostos, como gossypol, que têm propriedades tóxicas e podem atuar diretamente sobre os mecanismos celulares envolvidos na esporulação, resultando em uma redução significativa na viabilidade fúngica (Mendes, 2012; Ferreira, 2023).

Ao comparar os dados com a literatura existente, Dipieri *et al.* (2005), também consideraram o parâmetro de quantificação de conídios na análise de compatibilidade do fungo *B. bassiana* com o óleo emulsionável e extrato aquoso de sementes de nim. Nas concentrações 0,5%, 1,0% e 1,5% de óleo de nim, observaram que houve redução significativa na produção de esporos, correspondendo a 49,8, 66,3 e 78,7 (%). Em contrapartida, o extrato aquoso de sementes de nim nas concentrações 1%, 2% e 4%, apresentaram valores mais baixos de redução correspondendo, respectivamente, a 20,1, 28,8 e 41,5 %. Por outro lado, Marques e Monteiro avaliaram, ao realizar testes de compatibilidade com óleo de nim em *B. bassiana* e *M. anisopliae*, que *Beauveria ssp.* foi mais sensível quando associado ao óleo vegetal. Esses

resultados sugerem que além de considerar os óleos vegetais e suas concentrações, é importante levar em conta a sensibilidade do isolado em questão.

Outros estudos como os de Sá (2023), analisaram a compatibilidade entre o fungo *Cordyceps javanica* com Vegetal'Oil a 0,25%, 0,5%, 1% e constataram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos com Veget'Oil e o grupo controle. Isso sugere que o óleo não teve efeito inibitório nem estimulatório sobre esses processos no isolado fúngico estudado. Por esta tendência, destaca-se a importância da realização de pesquisas com vistas na interação de compostos com enzimas fúngicas, como as que estão envolvidas na biossíntese de esporos.

3.3 Viabilidade de conídios

A partir da análise de dados, verificou-se que a porcentagem de germinação dos conídios nos tratamentos com óleo de nim, variou entre 99% e 99,80%, apresentando alta viabilidade em todas as concentrações testadas. No tratamento controle, verificou-se média correspondente a $99,3 \pm 0,26$, seguido de $99,00 \pm 0,27$; $99,50 \pm 0,18$; $99,70 \pm 0,13$; $99,80 \pm 0,12$; e $99,53 \pm 0,17$ para as concentrações 1%, 2%, 3%, 4% e 5% respectivamente. A menor média representada pelo tratamento com óleo de nim na concentração de 1%. Baseando-se nos valores estatísticos $H=15,42$, $gl = 5$, $n=180$, $p\text{-value} < 0,05$, este foi o único tratamento em que foi observada diferença estatística (Figura 4).

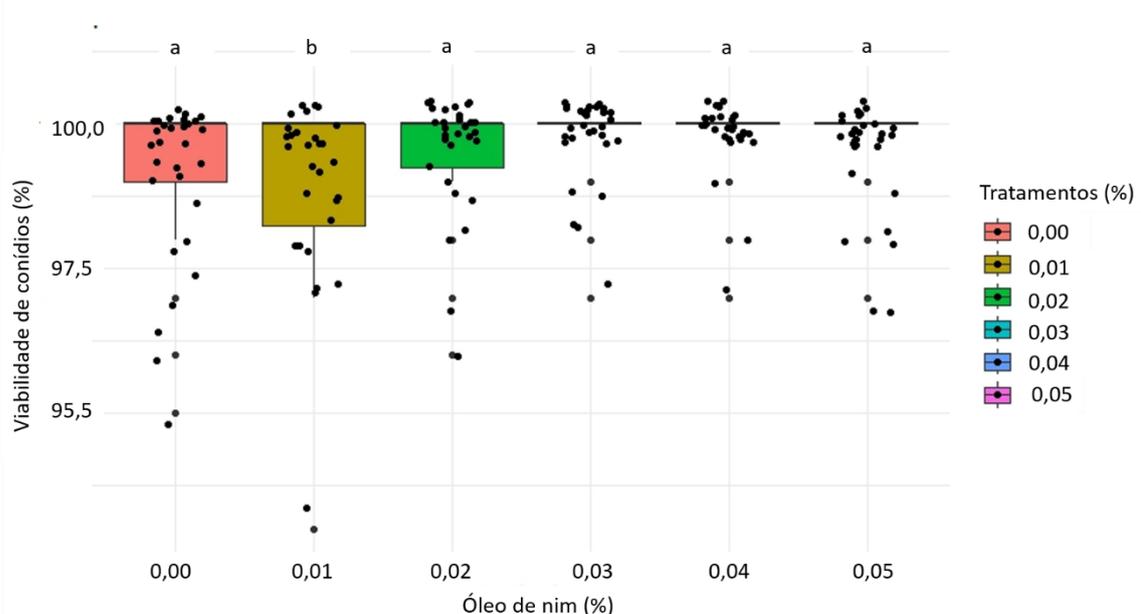


Figura 4. Valores (%) obtidos para viabilidade de conídios de *M. anisopliae* quando exposto à óleo de nim (1% a 5%), após 15 horas de inoculação.

Já nos tratamentos com óleo de algodão ($H= 143,25$, $gl = 5$, $n=180$, $p\text{-value} < 0,05$), o isolado MGSS 192 demonstrou maior viabilidade quando exposto à concentração de 2%, representando a melhor média obtida ($99,93 \pm 0,06$). Em contrapartida, quando inoculado nos meios tratados com as concentrações 4% e 5%, o fungo apresentou baixa viabilidade, representando as duas piores médias encontradas $34,43 \pm 1,50$ e $14,00 \pm 0,57$, respectivamente. Os demais tratamentos apresentaram média equivalente a $91,73 \pm 2,04$ para 1% e $97,13 \pm 0,88$ para 3% (Figura 5).

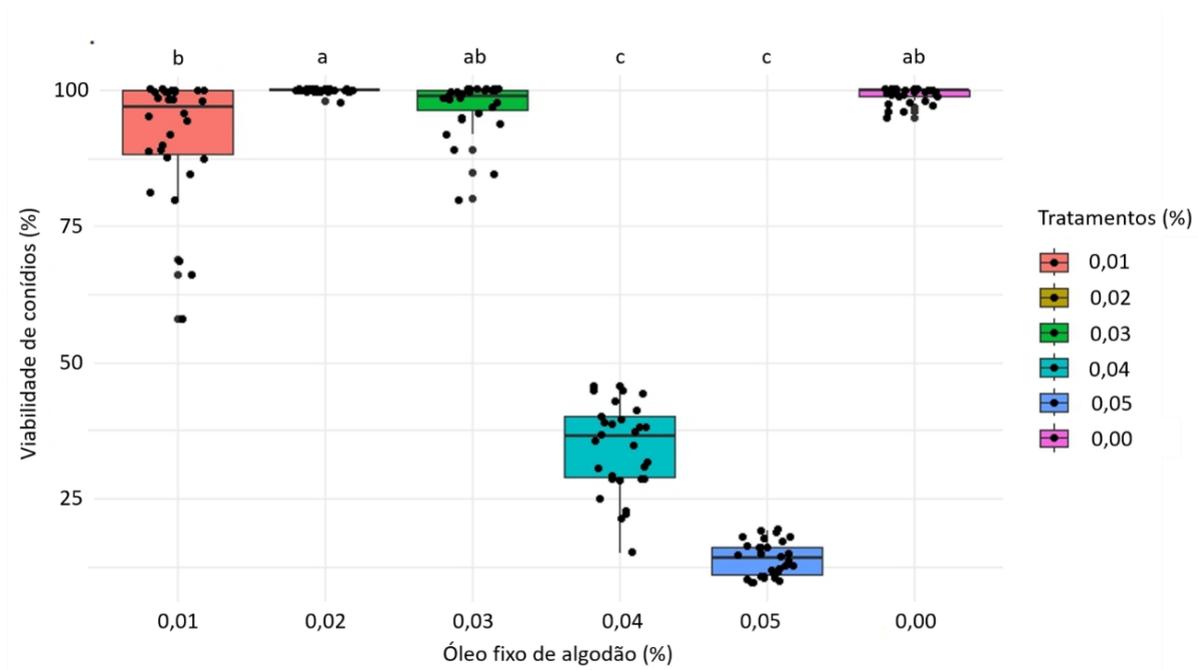


Figura 5. Valores (%) obtidos para viabilidade de conídios de *M. anisopliae* quando exposto à óleo fixo de algodão (1% a 5%), após 15 horas de inoculação.

Estudo semelhante foi realizado por Bontempo *et al.*, (2011), que avaliou a viabilidade de conídios de *M. anisopliae* após imersão com óleo de nim e extrato pirolenhoso, observando que nos tratamentos com óleo de nim obteve-se média igual 86,00% de germinação de conídios, comparando ao tratamento controle (90,67%) e ao tratamento com extrato pirolenhoso (25,00%). Os autores concluíram que o óleo de nim não inibiu a germinação das estruturas reprodutivas de *M. anisopliae*, sugerindo compatibilidade entre os dois. Araújo (2008), também verificou que a viabilidade do isolado CG30 de *M. anisopliae* não foi reduzida quando exposto às concentrações 0,125, 0, 25 e 0,5 (%) de óleo de nim.

Marques, Monteiro e Pereira (2004) demonstraram que mesmo em concentrações mais altas, o óleo de nim não inibe a viabilidade de conídios em *M. anisopliae*; os autores testaram concentrações de 5% a 11% do óleo vegetal sobre a viabilidade do entomopatógeno após 20 horas de inoculação e obtiveram médias próximas de 100% em todas as concentrações.

As médias obtidas ao avaliar este parâmetro, são complementares aos dados obtidos na quantificação de conídios. É válido ainda fazer um contraponto entre as médias observadas nos diâmetros das colônias, especialmente acerca dos tratamentos com o óleo de algodão (4% e 5%) que inibiram a germinação das estruturas reprodutivas, mas, ao mesmo tempo, não apresentaram efeitos negativos no crescimento das colônias, ou seja, não afetaram o corpo vegetativo do isolado, mas comprometeram o seu potencial de reprodução.

3.4 Determinação da compatibilidade e toxicidade dos óleos em relação ao isolado MGSS 192

Ao avaliar o valor de T, constatou-se que o óleo de nim, em todas as concentrações testadas (1% a 5%), mostrou-se altamente compatível com o isolado fúngico, como evidenciado pelos altos valores de T, que variaram entre 770,6 e 1.773,8. Essa alta compatibilidade indica que o óleo de nim não interfere negativamente no crescimento ou na viabilidade do fungo, sendo um adjuvante adequado para ser utilizado em conjunto com *M. anisopliae* em programas de controle biológico. O valor de T mais baixo (770,6) na concentração de 5% ainda é considerado compatível, mostrando que mesmo em concentrações relativamente altas, o óleo de nim mantém uma relação positiva com o fungo.

Em contraste, o óleo fixo de algodão apresentou resultados variáveis dependendo da concentração. Nas concentrações de 1% a 3%, o óleo foi classificado como compatível, com valores de T que variaram de 68,7 a 189,9. No entanto, ao alcançar concentrações de 4% e 5%, o óleo de algodão demonstrou alta toxicidade, com valores de T extremamente baixos (28,8 e 10,6, respectivamente). Esses valores indicam que em concentrações mais elevadas, o óleo de algodão tem um efeito inibitório significativo sobre o crescimento ou a viabilidade do fungo *M. anisopliae*, tornando-o inadequado para uso em tais níveis em aplicações de controle biológico (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis de toxicidade/compatibilidade de acordo com o valor de T (Toxicidade).

	Tratamentos	Valor de T	Classificação
Óleo de nim	Controle	506,6	-
	1%	912,0	Compatível
	2%	1.773,8	Compatível
	3%	1.232,3	Compatível
	4%	1.182,4	Compatível
	5%	770,6	Compatível
Óleo fixo de algodão	1%	171,6	Compatível
	2%	189,9	Compatível
	3%	68,7	Compatível
	4%	28,8	Muito tóxico
	5%	10,6	Muito tóxico

Os valores de T aqui expressos são resultados de todas as médias e tendências já observadas nos parâmetros anteriores. Em seus estudos, Saikia *et al.* (2023), testaram as concentrações 0,5%, 1,0% e 2,0% de óleo de nim quanto à sua compatibilidade com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Nas três concentrações testadas, o T calculado obteve valores iguais a 75.20, 68.92 e 63.92, respectivamente, indicando compatibilidade entre o entomopatógeno e o óleo vegetal. Por outro lado, os mesmos autores indicaram toxicidade do óleo de pinhão-manso ao mesmo fungo, com valores de T calculado iguais a 56.85, 51.05 e 45.72 para as concentrações 0,5%, 1,0% e 2,0%, respectivamente.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são de extrema relevância quando se tem em vista o uso associado de entomopatógenos e óleos vegetais para o controle de pragas agrícolas, já que demonstram utilização potencial dessa associação, sem que haja diminuição na germinação dos conídios e destacam a importância de selecionar cuidadosamente as concentrações de adjuvantes vegetais ao formular produtos para controle de pragas, garantindo que a eficácia do agente biológico não seja comprometida, além de preencher uma lacuna quanto à estudos que explorem o potencial do óleo fixo de algodão como adjuvante de entomopatógenos.

4 CONCLUSÕES

- Os tratamentos com óleo fixo de algodão e óleo de nim não inibiram o crescimento das colônias de *M. anisopliae* MGSS 192;
- O óleo de nim (1 a 5%) potencializou o crescimento das estruturas reprodutivas do isolado fúngico, apresentando médias maiores que o tratamento controle;

- As concentrações 4% e 5% do óleo fixo de algodão, inibiram a esporulação de MGSS 192;
- As médias obtidas nos testes de viabilidade, demonstraram compatibilidade do isolado exposto aos dois óleos vegetais, exceto nas concentrações 4% e 5% do óleo fixo de algodão
- Foi confirmada toxicidade do óleo fixo de algodão nas concentrações de 4% e 5% ao isolado MGSS 192 de *M. anisopliae*.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. *et al.* Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid, *Sitobion avenae* (Fab.) (Hemiptera: Aphididae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, p. 1-6, 2018.
- ALVES, L. R. M. *et al.* Crescimento vegetativo e esporulação de fungos entomopatogênicos em diferentes temperaturas. 2019.
- ARAÚJO, J. M. **Seleção de fungos entomopatogênicos associados ao óleo de nim para controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em couve.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2008
- ATAIDES, A. N. C. *et al.* **Caracterização fitoquímica de extratos vegetais e utilização em produção animal.** 2015.
- BARBOSA, L. F. **Seleção de fungos entomopatogênicos e sua combinação com o extrato de *Ricinus communis* contra *Aleurocanthus woglumi*.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BONTEMPO, L.F. *et al.* Extrato pirolenhoso, óleo de nim e fungos entomopatogênicos no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em condições de laboratório. **Cerrado Agrociências**, v. 2, p. 30-39, 2011.
- BOTELHO, A. A.; MONTEIRO, A. C. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 70, p. 361-369, 2011.
- CAMPOLO, O. *et al.* Essential oils in stored product insect pest control. **Journal of Food Quality**, v. 2018, n. 1, p. 6906105, 2018.
- CARVALHO, Robson *et al.* Compatibility of essential oils with *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuil. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 9, n. 3, p. 212-221, 2023.
- CHAUDHARI, A. K. *et al.* Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: Prospects and retrospects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 18918-18940, 2021.
- DEPIERI, R. A. *et al.* Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) com o óleo emulsionável e extrato aquoso de sementes de nim. 2005.

- FERREIRA, J. P. **Nanoemulsão de óleo de algodão contendo fitol para potencial atividade leishmanicida**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- HALDER, J.; DIVEKAR, P. A.; RANI, A. T. Compatibility of entomopathogenic fungi and botanicals against sucking pests of okra: an ecofriendly approach. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-7, 2021.
- LIMA, R. R. Nim (*Azadirachta indica*): **uma revisão bibliográfica sobre a fitoquímica e seu uso como inseticida natural**. 2022.
- MACHADO, C. M. B.; PIMENTEL, I. C. Biocompatibility of fungi and essential oils or vegetable extracts: a bibliometric review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e405101119874-e405101119874, 2021.
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, p. 1675-1680, 2004.
- MENDES, D. B. *et al.* Teor De Ácido Oleico nos Óleos de Girassol, Milho e Soja. **Revista de Trabalhos Acadêmicos** ISSN, v. 2179, p. 1584, 2012.
- POTRICH, M. *et al.* Compatibility of *Beauveria bassiana* and alternative phytosanitary products. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1802-1811, 2018.
- R CORE TEAM, 2024. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- RAYPURIYA, N.; DAS, S. B.; BHOWMICK, A. K. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, with various adjuvants. **J. Entomol. Zool. Stud.**, v. 7, p. 544-547, 2019.
- REHMAN, H. *et al.* Compatibility of some botanicals and the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.), against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, p. 1-7, 2020.
- SÁ, L. R. X Compatibilidade de *Akanthomyces* sp. e *Cordyceps javanica* a óleo vegetal, visando a formulação de dois micoinseticidas. Trabalho de Conclusão de Curso. 2023.
- SAIKIAA, B. *et al.* Compatibility study of entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) with promising plant oils. **Agricultural, mechanization in Asia**, 2023.
- SALDANHA, M. A. *et al.* Caracterização morfofisiológica de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de *Oncideres impluviata*. **Ciência Florestal**, v. 32, p. 776-792, 2022.
- SOHRABI, F. *et al.* Evaluation of the compatibility of entomopathogenic fungi and two botanical insecticides tondexir and palizin for controlling *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **Crop Protection**, v. 117, p. 20-25, 2019.
- WISUDA, N. L.; HARJAKA, T.; PRASETYANINGRUM, I. D. Compatibility between *Beauveria bassiana* (Bals.) and neem extract against brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal.). **Ilmu Pertanian**, v. 4, p. 9-14, 2019.

CAPÍTULO IV

AÇÃO REPELENTE DOS ÓLEOS VEGETAIS DE NIM E ALGODÃO SOBRE *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

RESUMO

Os óleos vegetais têm sido explorados acerca do seu potencial inseticida, conferido por seus compostos bioativos que podem atuar de maneira eficaz contra uma variedade de pragas. Pela realização de pesquisas, muitos óleos têm sua eficácia comprovada como repelente, dentre os quais, destacam-se o óleo de nim e o óleo fixo de algodão. Sendo assim, buscou-se avaliar a atividade repelente do óleo de nim comercial Fitoneem® (Concentração do i.a. 1,2 g/L) e do óleo fixo de algodão a partir da resposta de *Tenebrio molitor* Linneaus (Coleoptera: Tenebrionidae). Para tanto, foram considerados quatro tempos de exposição: 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas. A partir dos dados obtidos, o óleo de nim (1% a 5%), mostrou-se eficaz e manteve sua atividade repelente até o último intervalo de exposição, mesmo na concentração mais baixa, onde apresentou 35,5%, 40%, 38,5% e 40,5% das larvas do lado pulverizado da arena nos intervalos de 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas, respectivamente, demonstrando potencial de repelência sobre as larvas de *T. molitor*. Já os tratamentos com óleo de algodão (1% a 5%), mesmo na concentração mais alta perderam sua atividade repelente após o período de exposição de 24 horas, verificando-se 39%, 42%, 40% e 47% do número total de larvas contadas na metade pulverizada dos discos nos períodos de avaliação, respectivamente. Dessa forma, o óleo de nim apresentou uma ação repelente mais duradoura e consistente, enquanto o óleo de algodão demonstrou-se eficaz apenas a curto prazo.

Palavras-chave: Compostos bioativos naturais; Eficácia repelente; Exposição.

ABSTRACT

Vegetable oils have been explored for their insecticidal potential, attributed to their bioactive compounds that can act effectively against a variety of pests. Through studies, many oils have been proven effective as repellents, among which neem oil and cottonseed oil stand out. Thus, the aim was to evaluate the repellent activity of neem oil of the commercial Fitoneem® (a.i. concentration 1.2 g/L) and fixed cotton oil from the response of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). Four exposure times were considered: 1 hour, 3 hours, 6 hours, and 24 hours. Based on the data obtained, neem oil (1% to 5%) proved to be effective and maintained its repellent activity until the last exposure interval, even at the lowest concentration, where it showed 35.5%, 40%, 38.5%, and 40.5% of larvae on the sprayed side of the arena at intervals of 1 hour, 3 hours, 6 hours, and 24 hours, respectively, demonstrating repellency potential against *T. molitor* larvae. On the other hand, treatments with fixed cotton oil (1% to 5%), even at the highest concentration, lost their repellent activity after the 24-hour exposure period, showing 39%, 42%, 40%, and 47% of the total number of larvae counted on the sprayed half of the discs during the evaluation periods, respectively. Thus, neem oil presented a more durable and consistent repellent action, while fixed cotton oil proved effective only in the short term.

Keywords: Natural bioactive compounds; Repellent efficacy; Exposure.

1 INTRODUÇÃO

O uso de óleos vegetais como repelentes de insetos-praga tem atraído atenção significativa devido ao seu potencial para oferecer uma alternativa ecológica e sustentável aos pesticidas químicos (Farina; Conti, 2024). Esses óleos são derivados de plantas e possuem compostos bioativos que podem atuar de maneira eficaz contra uma variedade de pragas (Nile; Know; Nile, 2019). Entre os óleos vegetais amplamente estudados, destacam-se o óleo de algodão e o óleo de nim, ambos demonstrando eficácia como repelentes naturais (Ghosh *et al.*, 2021; Teodoro *et al.*, 2017).

O óleo fixo de algodão é conhecido por suas propriedades repelentes e tóxicas para diversos insetos-praga. Ele contém ácidos graxos essenciais e compostos como gossypol, que podem ter efeitos repelentes contra insetos praga (Wang *et al.*, 2009). Estudos como o de Shahid e Naczk (2003), têm mostrado que gossypol pode ser tóxico para pragas de grãos armazenados, como o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* (Coleptera: Curculionidae). O óleo de nim, derivado da árvore *Azadirachta indica*, é amplamente reconhecido por suas múltiplas propriedades inseticidas, fungicidas e repelentes. Pesquisas indicam que o óleo de nim é altamente eficaz contra uma variedade de pragas agrícolas, incluindo gafanhotos, moscas-brancas e ácaros. A presença de azadiractina, um dos principais compostos ativos do óleo de nim, é responsável por suas propriedades repelentes e tóxicas, interferindo no ciclo de vida dos insetos e reduzindo suas populações (Joshi *et al.*, 2019; Macchioni *et al.*, 2019; Aidoo *et al.*, 2021; Rajput *et al.*, 2021).

Além do óleo de algodão e do óleo de nim, outros óleos vegetais também têm mostrado potencial como repelentes de insetos. Por exemplo, o óleo de eucalipto, conhecido por seu composto ativo cineol, tem sido eficaz contra uma ampla gama de pragas, incluindo mosquitos e formigas (Canedo, 2020). O óleo de hortelã-pimenta, contendo mentol, também demonstrou eficácia repelente, especialmente contra mosquitos e pulgões (Nilo, 2015). Esses óleos oferecem alternativas adicionais e podem ser utilizados em combinação com outros métodos de controle para aumentar a eficácia geral do manejo de pragas (Coelho; Leal; Vasconcelos, 2019).

A utilização de óleos vegetais no controle de pragas não apenas contribui para a redução do uso de pesticidas químicos, mas também promove práticas agrícolas mais sustentáveis e seguras. A seleção adequada do tipo de óleo e da concentração a ser aplicada é fundamental para maximizar os benefícios e minimizar os impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana (Marangoni; Moura; Garcia, 2012).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial de repelência do óleo comercial Fitoneem (óleo de nim) e do óleo fixo de algodão sobre a resposta de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Montagem das arenas

Os procedimentos metodológicos foram realizados no laboratório de Entomologia da UEMA, Campus Paulo VI. Para este bioensaio, foram utilizados o óleo de nim comercial Fitoneem® (Concentração do i.a. 1,2 g/L) e o óleo fixo de algodão nas concentrações de 1% a 5%.

Para montagem das arenas, utilizou-se placas de petri nas dimensões 120 x 20 cm. Círculos de PVC foram cortados para se ajustarem às dimensões das placas de Petri; cada círculo de PVC foi marcado ao meio, e apenas um lado foi pulverizado com os óleos nas suas respectivas concentrações, utilizando-se torre de Potter a uma pressão de 34 kPa, de acordo com metodologia adaptada de Saraiva *et al.* (2021). Após uma hora de secagem, os círculos foram dispostos nas placas e 5 g de dieta de *T. molitor*, contendo farelo de milho e farelo de trigo (1:1) foram colocados de cada lado da arena, correspondendo ao lado pulverizado e não pulverizado. Dez larvas foram selecionadas aleatoriamente, independente do instar e liberadas no centro de cada arena.

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC). Foram aplicados cinco tratamentos diferentes para cada produto (óleos de nim e algodão), com dez repetições por tratamento.

2.3 Períodos de exposição

As arenas foram monitoradas e avaliadas dentro dos períodos de exposição de 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas a contar do momento em que as últimas dez larvas foram liberadas para registrar o comportamento, consumo de alimento e mortalidade, observando-se a preferência entre os lados pulverizado e não pulverizado.

2.4 Análises estatísticas

Os dados coletados foram analisados estatisticamente para determinar a eficácia e os efeitos dos diferentes tratamentos de óleos nas larvas ao longo do tempo. Os níveis de significância foram baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos dados obtidos, foi avaliada a resposta de *T. molitor* sobre as diferentes concentrações dos dois óleos dentro dos períodos de exposição já mencionados. Dessa forma, verificou-se que todos os tratamentos com óleo de nim foram repelentes em todos os intervalos de tempo (Figura 1).

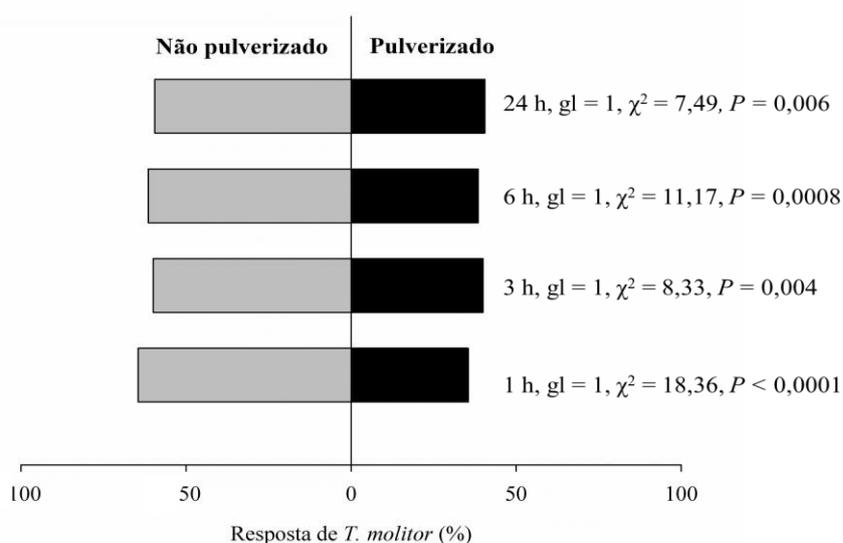


Figura 1. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (1%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

O tratamento com óleo de nim a 1%, manteve-se com uma porcentagem de 35,5%, 40%, 38,5% e 40,5% das larvas do lado pulverizado da arena nos intervalos de 1 hora, 3 horas, 6 horas e 24 horas, respectivamente, demonstrando potencial de repelência contra as larvas de *T. molitor* (Figura 1). No tratamento com óleo de nim a 2%, as porcentagens referentes ao número de larvas do lado pulverizado da arena nos quatro intervalos de avaliação foram de 38%, 42%, 39,5% e 38%, respectivamente, notando-se que não houve diferença entre os intervalos de 1 hora e 24 horas, demonstrando que o tratamento não perdeu suas propriedades de repelência ao longo do tempo, mantendo-se igualmente ativo (Figura 2).

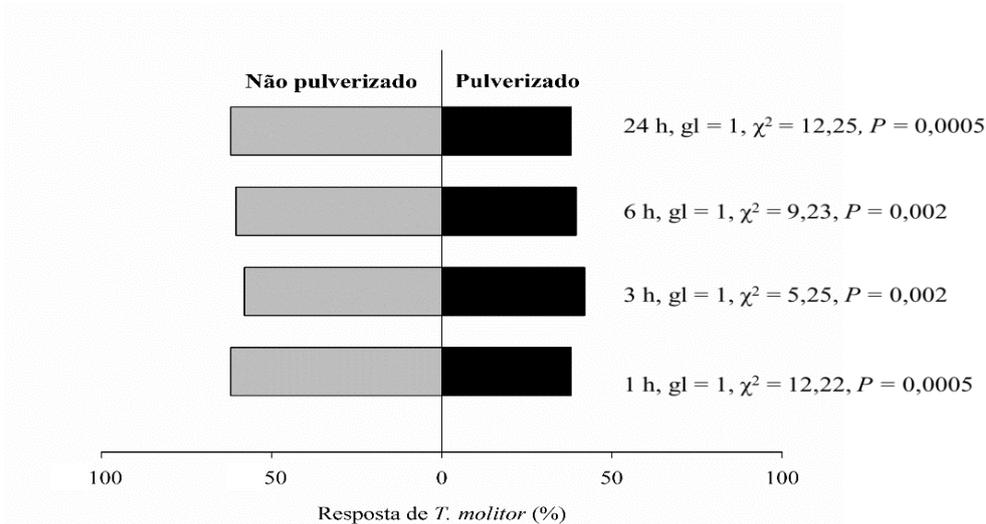


Figura 2. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (2%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

Nas arenas que foram pulverizadas com óleo de nim na concentração 3%, observou-se que após o intervalo de 24h, 38% das larvas se mantiveram no lado pulverizado, também demonstrando a eficiência do óleo no decorrer do tempo. Nos intervalos de 1h, 3h e 6h observou-se, respectivamente, 32,5%, 30% e 30,5% (Figura 3).

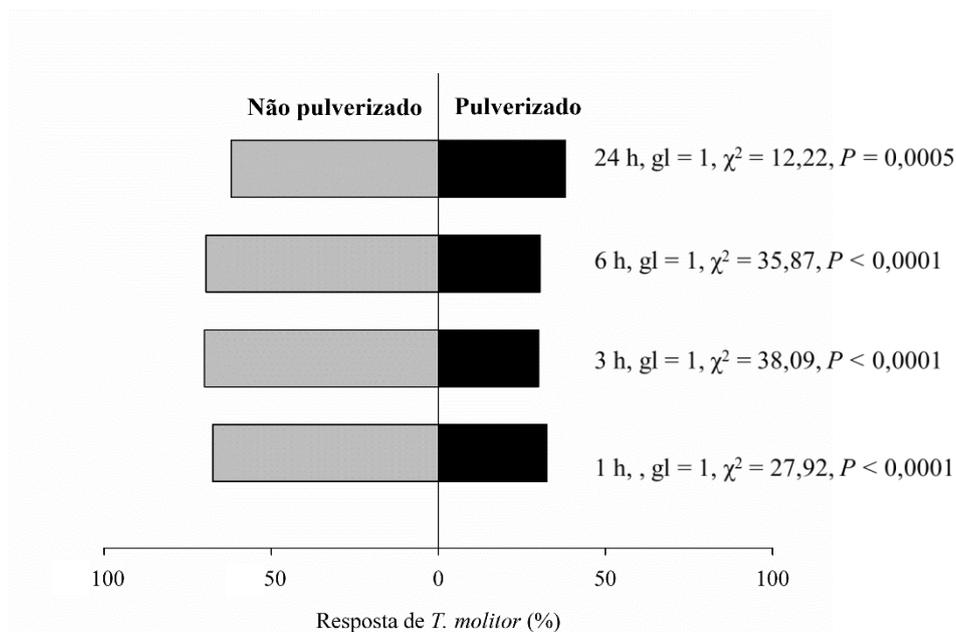


Figura 3. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (3%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

Nos tratamentos com óleo de nim a 4% e 5%, os resultados obtidos, quanto ao número de larvas do lado pulverizado da arena foram semelhantes. Na concentração 4%, constatou-se 34,5%, 33%, 36% e 37% nos intervalos de 1h, 3h, 6h e 24h respectivamente (Figura 4), enquanto nas arenas onde foi pulverizada a concentração de 5%, obteve-se 33%, 34,5%, 34% e 35,5% nos intervalos já mencionados (Figura 5).

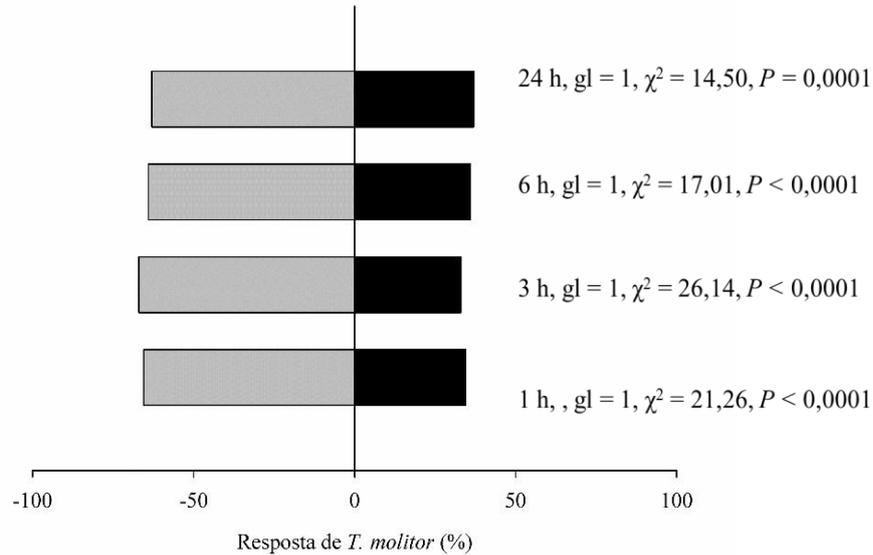


Figura 4. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (4%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

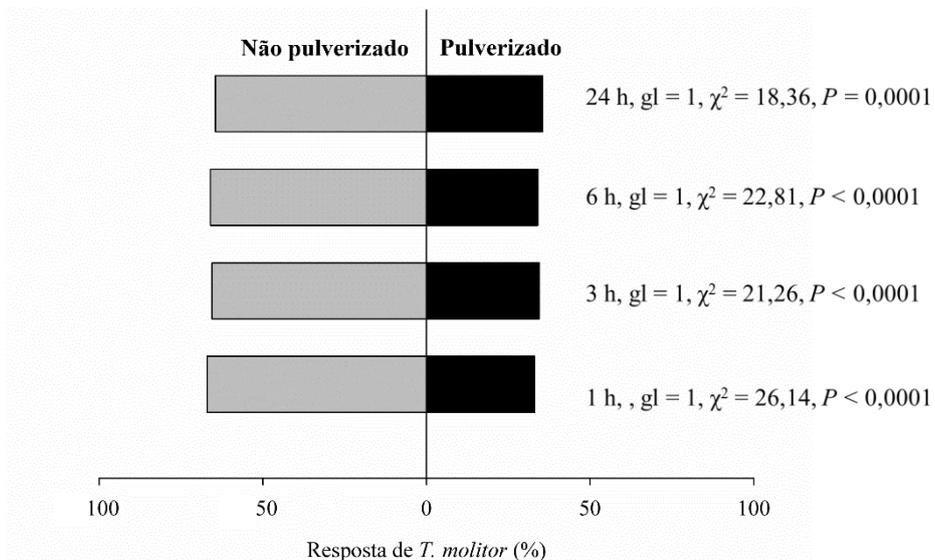


Figura 5. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo de nim (5%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

Nos tratamentos com óleo de nim, foi possível observar ainda mortalidade nas concentrações 1% (após 3 horas de exposição: duas larvas), 2% (após 24 horas de exposição: uma larva); 4% (após 3 horas de exposição: uma larva); e 5% (após 3 horas de exposição: quatro larvas). Todas as mortalidades constatadas foram observadas do lado pulverizado da arena, indicando possível toxicidade do óleo de nim em suas concentrações.

Em contrapartida, os tratamentos com óleo de algodão foram repelentes apenas nos três primeiros intervalos de avaliações. As cinco concentrações testadas não apresentaram repelência após 24 horas da instalação do experimento, demonstrando que o óleo perdeu seu potencial de atividade no decorrer do tempo. Percebeu-se também que nas avaliações realizadas no período de exposição de 6 horas, ocorreu maiores porcentagens do total de larvas que foram contadas do lado pulverizado das arenas. Dessa forma, no tratamento em que foi pulverizada a concentração 1% verificou-se que, nos períodos de exposição já mencionados foram contadas, respectivamente, 35%, 42%, 41,5%, e 46% do total de larvas do lado pulverizado (Figura 6), enquanto na concentração a 2%, obteve-se 39,5%, 40%, 39,5% e 43,5%, observando-se uma pequena diminuição nos percentuais, se comparado com o tratamento anterior (Figura 7).

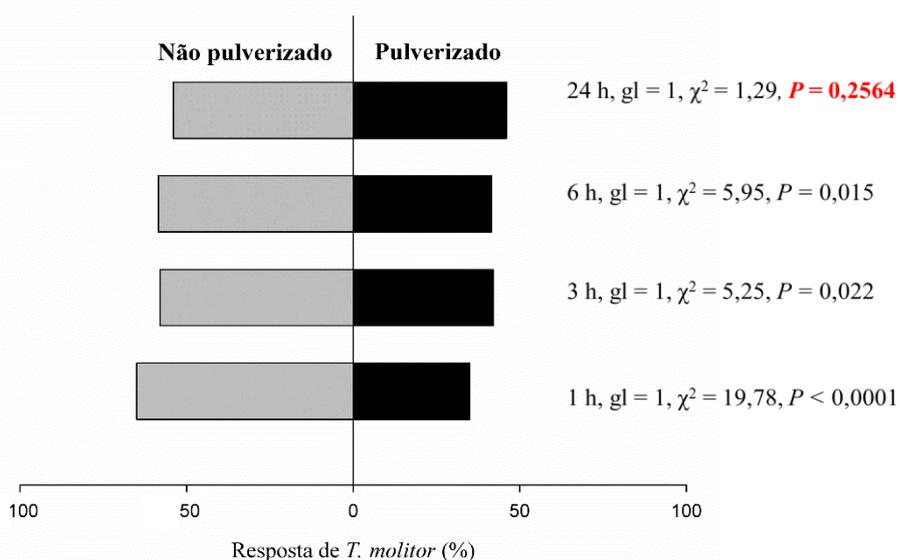


Figura 6. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (1%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

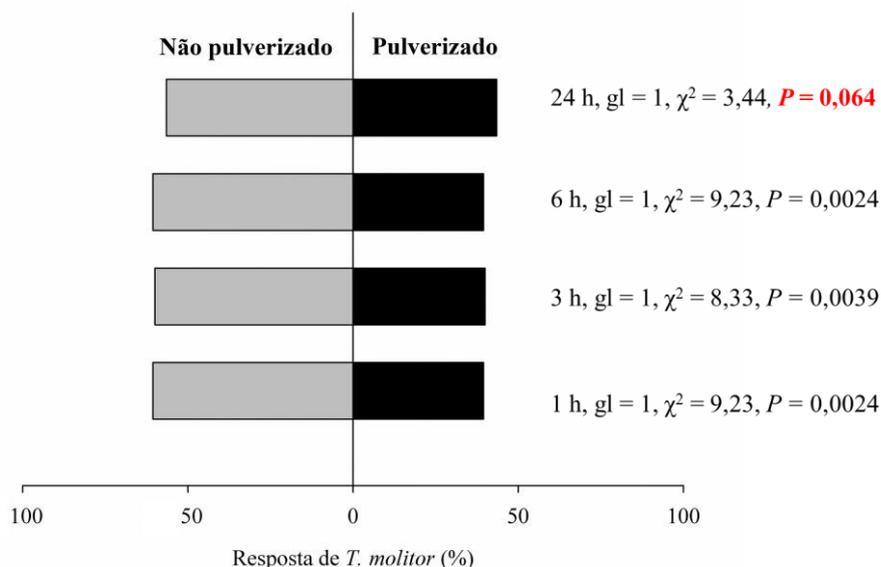
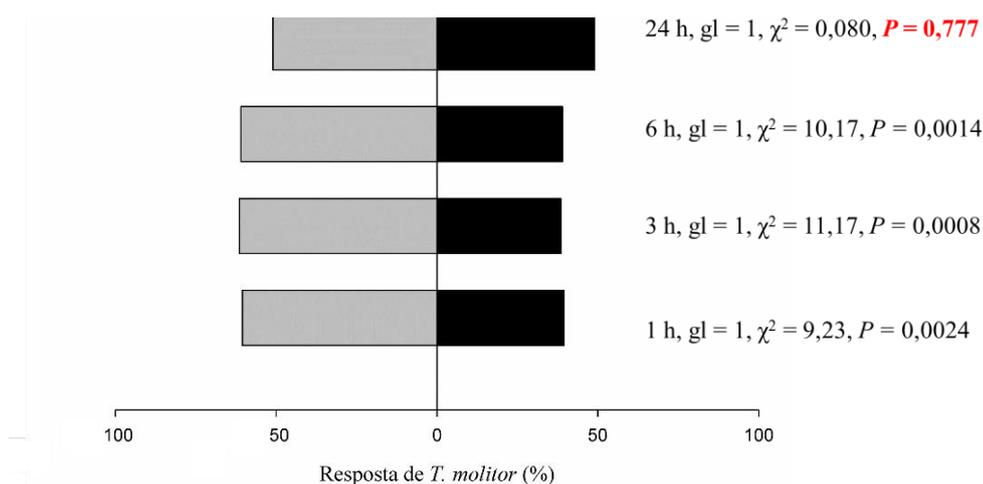


Figura 7. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (2%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

O tratamento com óleo de algodão a 3% foi o que apresentou maior percentual de larvas na metade pulverizada do disco, após o período de exposição de 24 horas, correspondendo à 49%. Os demais intervalos apresentaram os percentuais de 39,5%, 38,5% e 39%, respectivamente (Figura 8). Resultados próximos foram obtidos nas repetições que foram pulverizadas com a concentração de 4%, apresentando percentuais de 36%, 36,5%, 38,5% e 46,5% do número total de larvas de *T. molitor* (Figura 9).

Figure 8. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (3%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).



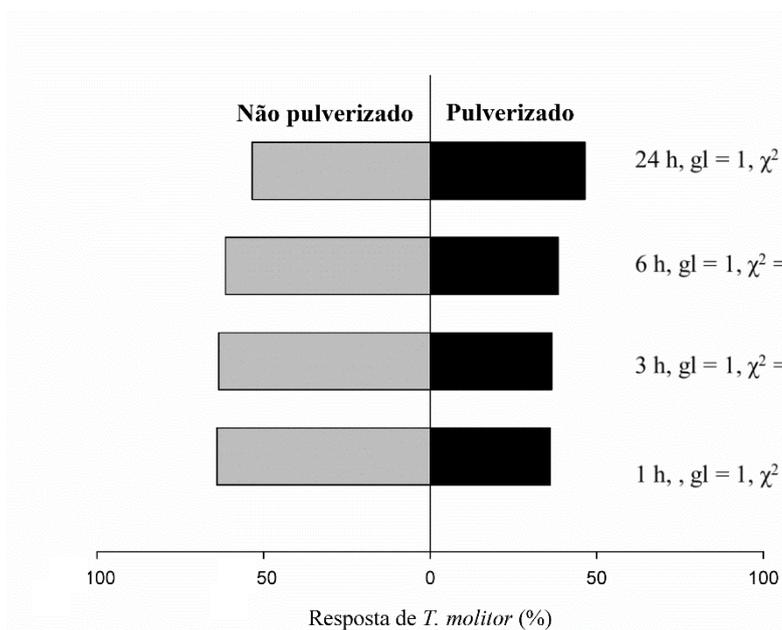
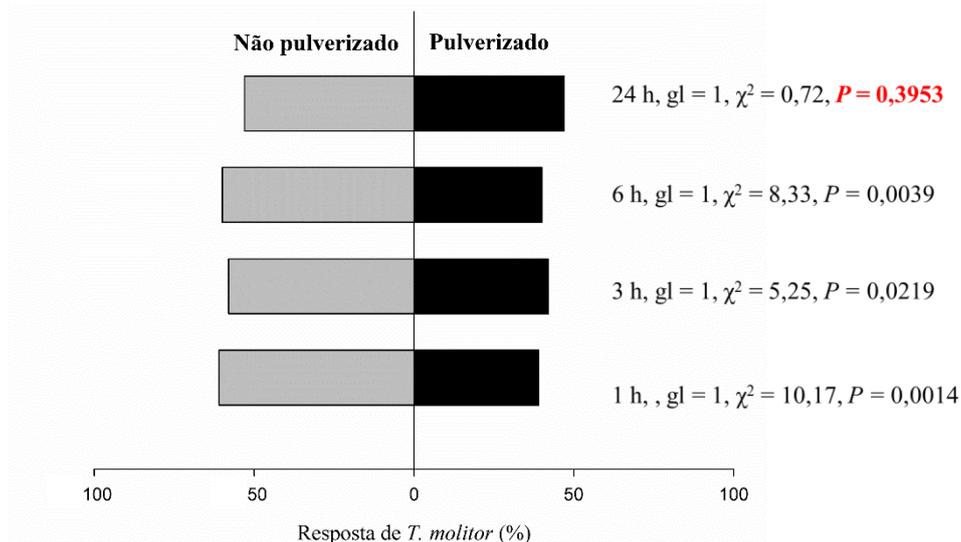


Figura 9. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (4%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).

Por último, o tratamento com óleo de algodão na concentração de 5%, apresentou 39%, 42%, 40% e 47% do número total de larvas contadas na metade pulverizada dos discos nos períodos de avaliação, respectivamente (Figura 10), verificando-se mais uma vez que o óleo de algodão manteve seu efeito repelente apenas até o período de exposição de 6 horas.

Figura 10. Resposta (%) da larva-da-farinha *Tenebrio molitor* sobre metade dos discos pulverizados (barras pretas) e não pulverizados (barras cinzas) com o óleo fixo de algodão (5%). O período de exposição foi de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada barra corresponde a proporção de 10 repetições. Os níveis de significância são baseados em análises de frequência ($\chi^2 < 0,05$).



Pesquisa semelhante foi realizada por Silva *et al.* (2022) ao avaliar o potencial repelente de óleo de nim sob infestação de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em grãos de milho armazenado, considerando os intervalos de avaliação de 1, 24, 48, 72, 96 e 120 horas e as doses de 2,5 e 5 L t⁻¹, constatando repelência em todas as doses avaliadas. Nos estudos de Luker *et al.* (2023), o óleo de nim foi amplamente estudado por suas propriedades repelentes, demonstrando eficácia significativa contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Em ensaios de contato, o óleo de nim mostrou ser um dos repelentes mais eficazes, proporcionando proteção por períodos prolongados.

Os mesmos autores também verificaram que o óleo de algodão tem um potencial moderado de repelência contra mosquitos *A. aegypti*. Sendo que o óleo de algodão reduziu a atração dos mosquitos por um período significativo, embora menos eficaz quando comparado a alguns outros óleos essenciais avaliados.

Nesse contexto, Shah *et al.* (2023) avaliou a atividade repelente dos óleos de amêndoa doce e soja por períodos de 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias sobre três pragas de grãos armazenados *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) e constataram que ambos os óleos exibiram efeito repelente, mas seu efeito diminuiu com o tempo e a concentração. Apesar de serem amplamente utilizados por sua atividade repelente e inseticida, os óleos perdem seu potencial de repelência ao longo do tempo, pois são suscetíveis à processos de oxidação que alteram sua composição química, reduzindo a eficácia de seus compostos repelentes, além disso alguns óleos podem evaporar com o tempo (Chiasson; Bostanian, 2004; Mishra *et al.*, 2006; Singh; Khare; Singh, 2012).

Al-Jabr (2006) também constatou eficiência ao testar a repelência de sete óleos vegetais contra *O. surinamensis* e *T. castaneum*. No estudo, foi constatada maior ação repelente do óleo de camomila *Matricaria chamomilla* L., onde o percentual de repelência atingiu 84,73% na concentração de 1%. Nisar *et al.* (2022), também avaliaram a atividade repelente de óleo de nim, verificando que o aumento da atividade repelente foi notado com óleo de nim nas concentrações 1,5% e 2,0%.

Diversos outros óleos de origem vegetal, como óleo de citronela, óleo de hortelã-pimenta e óleo de canela, também foram avaliados por suas propriedades repelentes. O óleo de citronela e o óleo de hortelã-pimenta reduziram a atração dos mosquitos por 60 minutos, enquanto o óleo de canela proporcionou proteção por até 120 minutos, sendo assim, a repelência

dos óleos vegetais está frequentemente associada aos compostos voláteis presentes neles. Diferentes óleos possuem diferentes perfis de terpenos, que são responsáveis pela variação na eficácia repelente (Selles *et al.*, 2021; Luker *et al.*, 2023).

5 CONCLUSÕES

- Os tratamentos com óleo de nim foram repelentes em todas as concentrações pulverizadas;
- O óleo de nim manteve sua ação repelente em todos os períodos de exposição (1, 3, 6 e 24 horas);
- O óleo de algodão foi repelente nas concentrações testadas, sendo eficaz somente até 6 horas após a aplicação;

REFERÊNCIAS

- AIDOO, O. *et al.* Chemical composition and in vitro evaluation of the mosquito (*Anopheles*) repellent property of neem (*Azadirachta indica*) seed oil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2021, n. 1, p. 5567063, 2021.
- AL-JABR, A. M. Toxicity and repellency of seven plant essential oils to *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)**, v. 7, n. 1, p. 49-60, 2006.
- CHIASSON, H.; BOSTANIAN, N. J. Propriedades inseticidas de um botânico baseado em *Chenopodium*. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 4, p. 1378-1383, 2004.
- FARINA, P.; CONTI, B. Liabilities of essential oils as insect repellents. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, p. 100564, 2024.
- GHOSH, S. *et al.* Neem oil as natural pesticide: Pseudo ternary diagram and computational study. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 98, n. 7, p. 100088, 2021.
- JOSHI, R. *et al.* Repelência do óleo de nim contra o besouro da farinha de ferrugem vermelha, *Tribolium castaneum* Herbst, (Coleoptera: Tenebrionidae) e a broca menor dos grãos, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 521-524, 2019.
- LUKER, H. A. *et al.* Repellent efficacy of 20 essential oils on *Aedes aegypti* mosquitoes and *Ixodes scapularis* ticks in contact-repellency assays. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 1705, 2023.
- MACCHIONI, F. *et al.* *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) neem oil as a repellent against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 6, p. 12, 2019.
- MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de ciências ambientais**, v. 6, n. 2, p. 92-112, 2012.
- MISHRA, D. *et al.* Insecticidal activity of vegetable oils against mustard aphid, *Lipaphis erysimi* Kalt., under field condition. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 5, p. 227-231, 2006.
- NILE, A.S.; KWON, Y. D.; NILE, S. H. Horticultural oils: possible alternatives to chemical pesticides and insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 21, p. 21127-21139, 2019.
- NILO, M. C. S. **Composição química e atividade antioxidante da hortelã pimenta (mentha piperita)**. 2015. Dissertação de Mestrado.
- NISAR, M. S. *et al.* Toxic and repellent impacts of botanical oils against *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae: Coleoptera) in stored cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plos one**, v. 17, n. 5, p. e0267987, 2022.
- RAJPUT, L. B. *et al.* Repellent potential of medicinal oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) under laboratory conditions. **Abasyn Journal of Life Sciences**, v. 4, n. 2, p. 7-15, 2021.

SELLES, S. M. A. *et al.* Acaricidal and repellent effects of essential oils against ticks: a review. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1379, 2021.

SHAH, J. A. *et al.* Odourless vegetable oils as insect pest repellents for short-term protection of various food packaging materials. 2023.

SINGH, A.; KHARE, A.; SINGH, A. P. Use of vegetable oils as biopesticide in grain protection- a review. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 3, p. 1-114, 2012.

TEODORO, A. V. *et al.* Bioactivity of cottonseed oil against the coconut mite *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae) and side effects on *Typhlodromus ornatus* (Acari: Phytoseiidae). **Systematic and Applied Acarology**, v. 22, n. 7, p. 1037-1047, 2017.

WANG, X. *et al.* Gossipol-um composto polifenólico da planta do algodão. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 58, p. 215-263, 2009.