

**TESTES COM COBERTURAS PARA INSETOS CADÁVERES
DE *Galleria mellonella* INFECTADOS COM *Heterorhabditis
indica* LPP30 (RHABDITIDA)**

ELIANA MONTEIRO SOARES DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

Abril 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 055/2013

Oliveira, Eliana Moteiro Soares de

Testes com coberturas para insetos cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida) / Eliana Monteiro Soares de Oliveira . – 2013.

72 f. : il.

Orientador: Cláudia de Melo Dolinski.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 60 – 72.

1. Insetos cadáveres 2. Cobertura protetora 3. *Heterorhabditis indica* LPP30 4. *Galleria mellonella* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 632.6257

**TESTES COM COBERTURAS PARA INSETOS CADÁVERES
DE *Galleria mellonella* INFECTADOS COM *Heterorhabditis*
indica LPP30 (RHABDITIDA)**

ELIANA MONTEIRO SOARES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Cláudia de Melo Dolinski

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Abril 2013

**TESTES COM COBERTURAS PARA INSETOS CADÁVERES
DE *Galleria mellonella* INFECTADOS COM *Heterorhabditis
indica* LPP30 (RHABDITIDA)**

ELIANA MONTEIRO SOARES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Comissão Examinadora:

Dr. Ramon Santos de Minas (D.Sc. em Produção Vegetal) - UENF

Dr. Vicente Martins Gomes (D.Sc. em Produção Vegetal) - UENF

Dr. Eleodoro Eduardo Del Valle (D.Sc. em Produção Vegetal) - UNL

Prof^a Claudia de Melo Dolinski (Ph.D. em Fitopatologia) - UENF

Orientador

*“Meu refúgio, minha fortaleza,
meu Deus! Eu confio em ti!”*

A

Deus

Pela presença constante em minha vida !!!!

Aos meus pais,

Maria da Graça Monteiro Soares de Oliveira,

Juscelino Soares de Oliveira

Que são as pessoas mais importantes da minha vida. Que me deram o dom da vida e sempre a encheram de muito amor e carinho. Ensinaram-me a ter objetivos na vida e a correr atrás deles, com dignidade e perseverança sempre acreditando em Deus e na minha capacidade de conseguir vencer.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter concedido-me forças para chegar até aqui e a todos que permaneceram ao meu lado apoiando-me, confortando-me e me incentivando incentivando-me a ter perseverança sempre;

À Dr^a. Cláudia de Melo Dolinski por ter muita paciência, compreensão e pelas palavras de incentivo nas horas difíceis durante o desenvolvimento do trabalho. Obrigado por ter confiado em mim para desenvolver esse trabalho;

Aos integrantes da banca examinadora Dr. Vicente Martins Gomes, Dr. Eleodoro Eduardo Del Valle e Dr. Ramon Santos de Minas por terem aceitado participar como membros efetivos da banca;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias pelo apoio logístico;

A FAPERJ pelos recursos financiados ao projeto;

A UENF pela concessão da bolsa de doutorado, a qual tornou possível a realização da minha formação;

A todos os funcionários da Universidade Estadual do Norte Fluminense;

A todos os colegas do Laboratório de Nematologia que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho;

Ao Prof. Jurandi e a todos os colegas do Laboratório de Pós-Colheita pela colaboração para a realização desse trabalho. Em especial aos amigos Willian e Anderson pela convivência e conhecimentos transmitidos;

Aos meus pais pelo esforço, dedicação e por estarem sempre ao meu lado orientando-me e me apoiando-me em minhas decisões e contribuindo cada vez mais para meu crescimento pessoal com seus ensinamentos e suas atitudes, que me servem de exemplo;

A todos os meus familiares que um dia incentivaram-me e em especial meu tio Carlos Roberto, Marilda e minha prima Marília.

Meus sinceros agradecimentos!!!

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Nematoides Entomopatogênicos	03
2.1.1. Biologia	05
2.2. Produção de nematoides entomopatogênicos “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”	07
2.3. <i>Heterorhabditis indica</i> LPP30	11
2.4. Aplicação dos nematoides entomopatogênicos	12
2.5. Coberturas protetoras de cadáveres	14
2.6. Biopolímeros ou polímeros biodegradáveis	14
2.6.1. Pectina	14
2.6.2. Polietileno glicol	16

2.6.3. Carragenina	18
2.6.4. Alginato de sódio	18
3. TRABALHOS	20
Testes de solubilidade das formulações para cadáveres de <i>Galleria mellonella</i> sob condições controladas de temperatura e umidade	20
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	24
Resultados e Discussão.....	35
Referências Bibliográficas	41
Efeito de diferentes coberturas protetoras em cadáveres de <i>Galleria mellonella</i> infectados com <i>H. indica</i> LPP30	43
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e Métodos	46
Resultados e Discussão.....	50
Referências Bibliográficas	57
4. RESUMO E CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

OLIVEIRA, Eliana Monteiro Soares de; D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2013. Testes com coberturas para insetos cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida). Orientador: Professora PhD. Claudia de Melo Dolinski.

A utilização dos nematoides entomopatogênicos em diferentes cultivos como insetos cadáveres é uma alternativa que deve ser considerada, especialmente, quando o inseto praga localiza-se no solo ou em ambientes crípticos. A praticidade e a eficiência dos insetos cadáver já estão comprovadas, mas ainda há necessidade de testar estratégias de como preparar esses cadáveres em larga escala com baixo custo. Desta forma, objetivou-se testar diferentes coberturas que proporcionem maior proteção e conservação aos insetos cadáveres de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30. Trabalhou-se com 4 tipos de substâncias: pectina, carragenina, polietileno glicol, alginato de sódio, todos com 50 cadáveres de *Galleria mellonella* para determinação das melhores condições de concentração e secagem. Na avaliação de progênie utilizando armadilhas de White modificadas utilizou-se 5 tratamentos mais o

controle (sem cobertura), ambos com 20 cadáveres cada. Os cadáveres foram cobertos totalmente com filmes de pectina a 2, 4, e 6%, carragenina a 1, 2,5, e 5%, polietileno glicol a 50, 100 e 200%, alginato de sódio a 1,5 e 3% e parcialmente com pectina a 6%. Dissolveu-se a pectina, a carragenina e o polietileno glicol em água destilada, aquecendo-se a solução em micro-ondas. Enquanto, o alginato de sódio foi dissolvido em água deionizada e polimerizado com cloreto de cálcio. As formulações foram colocadas individualmente em cada cadáver de *G. mellonella*. Testou-se a melhor condição de secagem colocando os cadáveres com cobertura de cada tratamento na BOD (25 °C e 100% UR) e na bancada sob condições de laboratório por 48 horas e verificou-se a reação dessas coberturas em contato com a areia. Avaliou-se progênie, infectividade dos juvenis provenientes dos insetos cadáveres formulados com pectina a 6%, carragenina a 5%, polietileno glicol a 200% e alginato de sódio a 1,5 %. As análises estatísticas foram feitas usando análise de variância dos resultados (ANOVA) e diferenças nas médias dos tratamentos foram determinadas utilizando o teste de Tukey em nível de 5% de significância. Conclui-se que as formulações a base de pectina a 6%, carragenina a 5%, polietileno glicol a 200% e alginato de sódio a 1,5 % foram as que melhor propiciaram a formação da cobertura para proteção dos cadáveres de *G. mellonella* com secagem em bancada à temperatura ambiente e que somente a cobertura de polietileno glicol dissolveu-se por completo quando colocada em contato com a areia umedecida. Verificou-se que, os filmes elaborados com as soluções de pectina e polietileno glicol dissolveram totalmente durante o período de coleta dos JIs das armadilhas de White, enquanto que os a base de carragenina e alginato de sódio sofreram reidratação. Observou-se que apenas ocorreu liberação de juvenis infectantes (JIs) no controle e no tratamento 3 (cadáver parcialmente coberto com pectina). As médias de JIs dos tratamentos não diferiram, contudo diferiram quando o experimento foi repetido. Verificou-se que valores médios da produção de JIs do controle (163.326) e do cadáver parcialmente coberto (97.450) no tempo 1 não diferiram entre si. No entanto, no tempo 2 os valores diferem entre si sendo a média no tempo 1 (141.435) superior à média no tempo 2 (66.833). Ressalta-se que a infectividade não diferiu em ambos os experimentos. Observou-se valores

médios de mortalidade para o controle de 7.8 e para o cadáver parcialmente coberto de 8.8 no tempo 1. No entanto, no tempo 2 os valores não diferem entre si sendo a média no tempo 1 de 6.6 e a média no tempo 2 de 6.6 em nível de 5% pelo teste de Tukey. Conclui-se que possivelmente todas as coberturas analisadas causaram uma restrição no oxigênio dos nematoides interrompendo assim a reprodução e assim apesar das formulações proporcionarem uma cobertura protetora ao cadáver elas interferem na emergência dos juvenis.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Eliana Soares de Monteiro, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2013. Tests with coverages for insect cadaver *Galleria mellonella* infected with *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida). Advisor: PhD Claudia de Melo Dolinski.

The use of different entomopathogenic nematodes in crops such as dead insects is an alternative that must be considered, especially when the insect pest is located on the ground or cryptic. The practicality and efficiency of insect corpse are already proven, but there is still need to test strategies on how to prepare these bodies on a large scale at low cost. Thus, this study aimed to test different coverages that provide greater protection and conservation of the insect *Galleria mellonella* cadavers infected by *Heterorhabditis indica* LPP30. Worked up with four types of substances: pectin, carrageenan, polyethylene glycol, sodium alginate, all *Galleria mellonella* bodies 50 for determining the best conditions of concentration and drying. In evaluating traps White progeny using modified 5 was used more control treatments (no coverage), both bodies 20 each. The bodies were totally covered with films of pectin at 2, 4, and 6% carrageenin, 1, 2.5, and 5% polyethylene glycol at 50, 100 and 200% sodium alginate and 1.5 to 3% and

partially pectin 6%. Dissolved pectin, carrageenan and polyethylene glycol in distilled water by heating the solution in a microwave. While sodium alginate was dissolved in deionized water and polymerized with calcium chloride. The formulations were placed individually in each body of *G. mellonella*. We tested whether the best drying condition placing the corpses with coverage of each treatment in BOD (25 0C and 100% RH) and bench under laboratory conditions for 48 hours and found the reaction to such coverage in contact with the sand. It was evaluated progeny from the infectivity of juvenile insect cadavers formulated with pectin 6%, 5% carrageenin, polyethylene glycol 200% sodium alginate and 1.5%. The statistical analyzes were performed using analysis of variance results (ANOVA) and differences in treatment means were determined using Tukey's test at 5% level of significance. It was concluded that the base formulation and 6% of pectin, 5% carrageenin, polyethylene glycol 200% sodium alginate and 1.5% showed the best led to the formation of protective cover for the bodies of *G. mellonella* with countertop drying at room temperature and only cover polyethylene glycol dissolved completely when placed in contact with moist sand. It was found that the films prepared with the solutions of pectin and polyethylene glycol dissolved completely during the collection traps of IJs white, while the base carrageenan and sodium alginate suffered rehydration. It was observed that there was only release of infective juveniles (IJs) in the control and treatment 3 (body partly covered with pectin). The average IJs treatments did not differ, but differ when the experiment was repeated. It was found that the average values of the production of IJs control (163,326) and the body partially covered (97,450) at time 1 did not differ. However, in the second time values which differ in the mean time the first (141,435) higher than the average second time (66,833). It is noteworthy that the infectivity was not different in both experiments. It was observed average mortality for the control of the body and 7.8 part 8.8 covered at one time. However, in the second time values which do not differ in the mean time and the mean 1 6.6 2 6.6 time at 5% level by Tukey test. It is concluded that possibly covers all analyzed caused a restriction in the oxygen interrupting nematode reproduction and so although the formulations provide a protective covering to the body they interfere with emergency juveniles.

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico utilizando nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem apresentado bons resultados no controle de várias pragas da agricultura (Del Valle *et. al.*, 2008). Os nematoides entomopatogênicos pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são parasitas obrigatórios de insetos e são frequentemente usados como biocontroladores no controle biológico de pragas de importância econômica (Adams *et. al.*, 2006).

Geralmente, agentes de controle microbiano, como nematoides são aplicados de forma curativa para alcançar a supressão de pragas, aplicações profiláticas são raras. Nematoides aplicados de forma preventiva durante ovoposição de *Synanthedon exitiosa* podem reduzir os níveis de danos causados por insetos similar ao que é conseguido com inseticida recomendado para os tratamentos (Shapiro-Ilan *et al.*, 2009).

Ao longo dos anos foram conseguidos avanços na produção em escala comercial de nematoides entomopatogênicos. Contudo, o aumento na sua utilização em sistemas (agrícolas sustentáveis) ou nos sistemas de controle integrado depende de avanços tecnológicos para produzi-los produzi-los em escala industrial e com baixo custo de produção (Del Valle *et. al.*, 2008). Existem dois sistemas na produção em massa de nematoides entomopatogênicos, que são: a produção *in vivo* e a produção *in vitro* em substrato sólido ou líquido. Esses sistemas de produção são capazes de gerar NEPs em pequena, média e larga

escala, mas os altos custos do processo ainda constituem um fator limitante para o seu uso (Del Valle *et. al.*, 2008).

Nas últimas duas décadas, as pesquisas referentes a métodos e tecnologias de aplicação destes organismos estiveram focadas nas aplicações em suspensão aquosa, através de sistemas de irrigação (Shields *et. al.*, 1999). Uma vasta gama de tecnologia está disponível para aplicação de nematoides entomopatogênicos, incluindo vários sistemas de irrigação e equipamento de pulverização. A escolha do equipamento de aplicação, e a forma em que os nematoides são aplicados, podem ter um impacto substancial sobre a eficácia no controle de pragas. Por exemplo, os tipos de sistema de bocal ou de bombeamento são alguns dos parâmetros que podem afetar o desempenho do nematoide (Shapiro-Ilan *et. al.*, 2006).

A aplicação de NEPs em pomares comerciais através insetos cadáveres é uma alternativa que deve ser considerada, especialmente, quando o inseto praga localiza-se no solo ou em ambientes crípticos (Shapiro-Ilan *et al.*, 2003 e Bruck *et al.*, 2005). Contudo, danos físicos em cadáveres de insetos hospedeiros infectados por NEPs são frequentes durante a manipulação e aplicação desses para controle biológico de pragas agrícolas (Shapiro-Ilan *et al.*, 2001).

Lewis &. Shapiro-Ilan (2002) verificaram que os nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema glaseri* e *Steinernema feltiae* quando dentro do cadáver e expostos a congelamento ocorre uma maior sobrevivência dos juvenis infectantes. Quando os cadáveres são congelados por dois ou três dias após a infecção, observa-se emergência de alguns juvenis, enquanto que quando o congelamento é entre cinco e sete dias após a infecção se tem um efeito negativo, não observando emergência dos juvenis.

A eficiência na utilização de insetos cadáveres pode ser incrementada mediante coberturas protetoras, que protegem esses de danos físicos derivados da manipulação e aplicação e, dependendo do tipo de cobertura, podem até resguardar os mesmos de condições adversas do ambiente (Del Valle *et. al.*, 2009). Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho testar diferentes coberturas que proporcionem maior proteção e conservação para os cadáveres de *Galleria mellonella*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nematoides Entomopatogênicos

Nematoides entomopatogênicos pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda), na qual estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994, enquanto que a família Heterorhabditidae possui apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976.

Os estudos sobre taxonomia, biologia, genética, ecologia, gama de hospedeiros, tecnologia de aplicação em laboratório e no campo das últimas décadas, destacaram os nematoides do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* como excelentes candidatos a agentes do controle alternativo de insetos pragas (Del Valle, 2008).

Nematoides entomopatogênicos das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae têm sido encontrados em diversas regiões do mundo, desde árticos até tropicais, apresentando um vasto leque de hospedeiros (Poinar, 1990; Hominick *et al.*, 1996; Adams & Nguyen, 2002). Em laboratório, colonizam mais de 250 espécies de insetos de aproximadamente 75 famílias pertencentes a 11 ordens de insetos e podem infectar larvas, pupas e adultos (Poinar, 1979; Poinar 1990; Peters, 1996).

Uma característica adicional que destaca os NEPs dentre os agentes do controle biológico é a sua capacidade de dispersão e busca do hospedeiro. Os NEPs são atraídos pelas atividades fisiológicas do hospedeiro, como a respiração, que ocasiona diferenças de CO₂ (Gaugler *et al.*, 1989).

Nematoides entomopatogênicos possuem atributos que os fazem agentes controladores de pragas de sucesso. Eles infectam seletivamente grande diversidade de insetos, sem causar danos às plantas e aos outros animais (Akhurst & Smith, 2002); são capazes de provocar morte rápida dos insetos pragas que lhes servem de hospedeiros (24 a 48 horas); possuem boa eficiência contra pragas do solo e de ambientes crípticos (Capinera & Epsky, 1992).

A eficácia do controle de insetos pragas com NEPs depende da temperatura ambiental na qual eles são liberados no solo (Kaya, 1990; Grewal *et al.*, 1994b). A temperatura influencia a proporção de reservas alimentares (lipídios, proteínas e carboidratos), utilizadas pelos nematoides para sua mobilidade, sobrevivência, infectividade, desenvolvimento e reprodução. A virulência e a reprodução de *Heterorhabditis* spp. é reduzida em temperaturas superiores a 30 °C (Grewal *et al.*, 1994b). Ao se incrementar a habilidade dos NEPs em viver e ser infectantes a temperaturas mais elevadas (35 - 40 °C) pode-se melhorar a sua eficácia em condições de campo e ampliar o seu uso como agentes do controle biológico. Para superar os efeitos prejudiciais da elevada temperatura sob a patogenicidade e virulência dos NEPs, vários pesquisadores têm desenvolvido melhoramento genético de populações para esta característica (Del Valle *et al.*, 2005a).

O controle biológico com NEPs é limitado pela sensibilidade dos nematoides a condições extremas (Kaya e Gaugler, 1993). A temperatura causa influência nos processos metabólicos, principalmente na taxa de utilização de reservas (lipídios, proteínas e carboidratos), na mobilidade, na sobrevivência, na infectividade, no desenvolvimento e na reprodução (Dunphy e Webster, 1986). Outro fator que influencia a atividade dos NEPs é a sua tolerância à dessecação. Todos os nematoides são organismos aquáticos e necessitam de uma película de água ao redor deles para se mover. Sob condições ambientais de baixa umidade a sobrevivência e mobilidade dos NEPs é negativamente afetada (Kaya & Gaugler, 1993).

Heterorhabditis baujardi LPP7 é um NEP com parâmetros biológicos específicos. Segundo Dias *et. al.* (2008), a produção de JIs de *H. baujardi* LPP7 mostrou-se dependente da dose do nematoide e da massa das larvas do inseto utilizado, parâmetros que devem ser considerados na produção *in vivo*, em larga escala, desse NEP. Segundo Lara (2006), o nematoide *H. baujardi* LPP7 pode suportar temperaturas até 35 °C sem ser afetado em sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento até larvas de *G. mellonella*. As temperaturas superiores a 40 e 45 °C diminuem a viabilidade de nematoides, além de prejudicar sua patogenicidade e deslocamento. Ressalta-se que segundo Kaya (1990), a amplitude que permite o aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico é relativamente estreita e a sua infectividade e persistência é comprometida por temperaturas superiores a 30 °C e inferiores a 15 °C. Conforme Grewal (1998), à aplicação dos NEPs deve-se levar em conta que em geral, estes não devem ser submetidos à temperaturas superiores a 30 °C.

2.1.1. Biologia

A principal via de ingresso dos NEPs nos insetos são os espiráculos. As vias alternativas são a cavidade oral e o ânus, mas pode haver resistências, pois os nematoides podem ser mastigados no processo de limpeza corporal que é comum a alguns insetos, como as larvas da família Curculionidae. Juvenis infectantes do gênero *Heterorhabditis* utilizam uma projeção da cutícula semelhante a um “dente” presente na sua parte anterior para perfurar a cutícula do hospedeiro, por isso são considerados mais infectantes do que os JIs de *Steinernema* (Eidt & Thurston, 1995).

Uma vez dentro do hospedeiro, os JIs liberam parte das bactérias simbiontes na hemocele do inseto hospedeiro que vão causar a morte do hospedeiro (Poinar, 1990). As bactérias se multiplicam rapidamente causando septicemia e matando o hospedeiro em 24 a 48 horas (Forst e Clarke, 2002). Adicionalmente, as bactérias fornecem os nutrientes para o desenvolvimento e multiplicação dos nematoides (Forst e Clarke, 2002), além de servirem como defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990). Os nematoides completam seu desenvolvimento e permanecem por duas ou três gerações dentro do

hospedeiro. Quando o alimento é esgotado, os JIs saem do hospedeiro à procura de novos hospedeiros (Grewal e Georgis, 1999).

No gênero *Steinernema*, os JIs carregam bactérias simbiotes em uma vesícula localizada na região anterior do intestino, penetrando no corpo de um determinado hospedeiro através de suas aberturas naturais como cavidade oral, ânus e espiráculos (Forst & Clarke, 2002). Subsequentemente, os NEPs passam à hemocele, onde liberam suas bactérias simbiotes. Estas se multiplicam rapidamente e, após curto período, causam septicemia e morte do hospedeiro.

O cadáver fica então tomado por uma “sopa bacteriana”, ou seja, um meio rico em nutrientes constituído pelas bactérias e por tecidos do inseto já desorganizados, dos quais os nematoides se alimentam e se desenvolvem, passando pelo último estágio de juvenil (J4) e se tornando adultos da primeira geração (machos e fêmeas). Em geral, os juvenis originados por esses adultos ainda têm ao seu dispor, apreciável quantidade de alimento, conseguindo completar o ciclo e formar os adultos da segunda geração dentro do corpo do hospedeiro.

Após o surgimento e acasalamento dos adultos da segunda geração, tem-se a formação de uma população de juvenis que se alimentam do resto do cadáver e depois o abandonam, passando para o solo em busca de novos hospedeiros. Antes dos JIs deixarem o cadáver, as bactérias simbiotes são apreendidas na vesícula especializada (Adams & Nguyen, 2002).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Heterorhabditis* é similar ao descrito para o gênero *Steinernema*, com a diferença de que a primeira geração de adultos no inseto morto compõe-se unicamente de hermafroditas, surgindo machos e fêmeas anfimíticos na segunda geração e, sempre, nas seguintes. Além disso, as bactérias simbiotes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos JIs, que não possui vesícula (Adams e Nguyen, 2002). Para ambos os gêneros, as temperaturas na faixa de 18 - 28 °C, o ciclo de vida é completado em 6 a 18 dias, dependendo também do inseto hospedeiro e da espécie de nematoide (Poinar, 1990; Zioni *et. al.*, 1992).

Os JIs são morfológica e fisiologicamente adaptados à vida-livre e correspondem ao terceiro estágio juvenil do ciclo de vida dos nematoides (J3). Durante este estágio, os nematoides não se alimentam e dependem de suas

reservas internas até encontrarem um novo hospedeiro. Estas reservas se encontram no intestino, principalmente na forma de glicogênio (Glazer, 2002). Esse estágio é considerado o único de vida livre dos NEPs (Poinar, 1990).

NEPs, devido seu habitat natural ser o solo, são influenciados pelas características deste como tamanho dos poros, umidade, ausência de oxigênio, temperatura e pH (Barbercheck, 1992). Os NEPs neste estágio são mais resistentes devido à existência da cutícula do terceiro estágio e à do segundo estágio, que fica retida. Esta proteção tem um papel fundamental, pois auxilia contra a dessecação e o ataque de antagonistas (Poinar, 1979).

Conforme Gaugler (1997), a estratégia dos JIs para encontrar seus hospedeiros é variável entre as distintas espécies de NEPs e pode ser classificada em “ambusher” ou “cruiser”. Os NEPs com estratégia “ambusher” esperam seu hospedeiro fazendo nictação, isto é, ficam eretos e apoiados em suas caudas, aguardando para saltar em direção ao hospedeiro quando ele se aproxima. Por outro lado, os NEPs com estratégia “cruiser” procuram ativamente seus hospedeiros, movimentando-se pelo solo, provavelmente atraídos por dióxido de carbono e outras substâncias químicas liberadas pelos hospedeiros.

Os NEPs com estratégia “cruiser” são mais efetivos contra insetos de pouca mobilidade no solo, enquanto que os com estratégia “ambusher” são mais efetivos contra alvos móveis. Existem também algumas espécies com comportamento intermediário aos descritos anteriormente, fazendo nictação por algum tempo e também se movimentando no solo (Gaugler, 1997).

2.2. Produção de nematoides entomopatogênicos “*in vivo*” e “*in vitro*”

Nos últimos anos foram conseguidos avanços na produção em escala comercial de nematoides entomopatogênicos. Por outro lado, o aumento da sua utilização em sistemas agrícolas sustentáveis ou nos sistemas de controle integrado depende de avanços tecnológicos para produzi-los em escala industrial e a baixo custo de produção (Del Valle *et. al.*, 2008).

Atualmente são usados frequentemente dois sistemas na produção em massa de nematoides entomopatogênicos, que são a produção *in vivo*, nos

insetos cadáveres e a produção *in vitro* em substrato sólido ou líquido (Del Valle *et. al.*, 2008).

A produção *in vivo* é o método mais simples e o mais usado para multiplicar NEPs, e consiste na utilização de insetos hospedeiros. A técnica foi desenvolvida pela primeira vez por Glazer (1931), mas foi Dutky (1964) que obteve pela primeira vez uma grande produção de JIs em larvas de *G. mellonella*. É uma técnica simples, mas o custo de produção pode ser elevado e não permite uma economia de escala. O número de juvenis obtidos depende da suscetibilidade do hospedeiro, e da espécie de nematoide multiplicada (Molina *et. al.*, 2001). A média de produção nesse hospedeiro é de 30.000 a 50.000 JIs por larva (Poinar, 1979), podendo chegar até 200.000 (Dutky *et al.*, 1964). Segundo Dias *et. al.* (2008), para *H. baujardi* LPP7, doses de 10, 100 e 300 JIs aplicadas sobre larvas de *G. mellonella* com 100 a 300 mg são adequadas para a maior produção de 3.330, 4.759 e 4.749 JIs / mL.

Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) conhecida como grande traça dos favos é um hospedeiro susceptível a nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, sendo por isso utilizada para multiplicação desses patógenos (Minas, 2012).

A criação de *G. mellonella* em laboratório é de grande importância para a multiplicação de nematoides entomopatogênicos, fundamental para estudos de controle biológico. Em bioensaios verificou-se que o período de duração dos estágios imaturos é inversamente proporcional à temperatura (Cardoso *et.al.*, 2007). A maior sobrevivência para o estágio larval ocorreu a 32 °C; no entanto, para os estágios embrionários e pupal, as maiores sobrevivências foram registradas a 27 °C e 22 °C, respectivamente. A temperatura base para a espécie foi de aproximadamente 11 °C para o desenvolvimento embrionário, 8 °C para o estágio larval e 2 °C para o pupal (Lindgren *et. al.*, 1993).

As lagartas dessa espécie são também empregadas como hospedeiros alternativos para a criação de parasitoides e de outros inimigos naturais de pragas prejudiciais ao agrossistema (Rijo *et. al.*, 1996).

Conforme Cardoso *et. al.* (2007), o período de incubação varia de 6,8 (32 °C) a 13,4 dias (22 °C), sendo decrescente com a elevação térmica, na faixa testada. A duração do estágio larval foi decrescente na faixa de temperatura

avaliada, com durações médias variáveis de 40,4 (22 °C) a 23,4 dias (32 °C). A maior sobrevivência foi obtida a 32 °C (96,7%), indicando ser esta a temperatura ideal para o desenvolvimento de larvas de mariposas da cera, por apresentar também a menor duração dessa fase, viabilizando sua criação em laboratório. Assim, pode-se utilizar a temperatura de 22 °C quando se desejar retardar a velocidade de desenvolvimento, aumentando o tempo de utilização das larvas em laboratório, sem prejuízo ao desempenho biológico do inseto. Foram registradas durações médias de 18,2 dias a 22 °C e 15,0 dias a 32 °C, semelhante à fase larval, a melhor condição térmica para o desenvolvimento de pupas, foi 32 °C, embora a sobrevivência tenha sido menor do que nas outras temperaturas. O estágio de pupa apresentou a maior sobrevivência a 22 °C, garantindo o maior número de adultos para o manejo das colônias nos laboratórios .

Cardoso *et. al.* (2007) baseando-se nos parâmetros velocidade de desenvolvimento e produtividade na obtenção dos estágios de *G. mellonella*, propõem a manutenção da fase de ovo a 27 °C, com maximização tanto da velocidade de desenvolvimento quanto da produtividade. Em relação à larva, e pelos mesmos motivos a temperatura ideal é a de 32 °C. O estágio pupal, entretanto, pode ser mantido à temperatura de 22 °C quando se prioriza o aspecto produtividade de espécimes, que foi de 95,7% comparado com 71% à temperatura de 32 °C, ou a 32 °C quando o objetivo é a velocidade de desenvolvimento, 12,2 dias comparado a 18,2 dias à temperatura de 22 °C.

As larvas de insetos são infectadas adicionando-se juvenis infectantes em meio aquoso a um papel absorvente ou submergindo as larvas no mesmo meio. Em geral são utilizados cerca de 100 JIs por larva no primeiro método e 4.000 JIs/mL no segundo, podendo ser submersas nessa solução mais de 400 larvas (Shapiro-Ilan *et. al.*, 2002).

Segundo Poinar (1990), pode-se obter de 100.000 a 300.000 JIs por larva infectada. Essas larvas infectadas adquirem uma coloração característica do complexo nematoide-bactéria após 24 a 48 horas de infecção. Depois de ter completado dois a três ciclos do nematoide no hospedeiro (cerca de 5 a 10 dias), já não há alimento disponível e os juvenis infectantes começam a deixar os cadáveres em busca de novos hospedeiros. Essa etapa, chamada de coleta, pode ser feita em diferentes escalas, desde placas de Petri (White, 1927), até em

sistemas de coleta para grande volume de nematoides, como o método LOTEK proposto por Gaugler & Han (2002). Depois de coletados, os JIs podem ser armazenados em água, esponja, gel, ou em outros substratos inertes a temperaturas de 4 °C a 16 °C, por um a três meses.

Cada espécie de nematoide possui tempo e temperatura ótimos de armazenamento, podendo haver queda na infectividade dos JIs. O maior custo nesse sistema tem sido a dieta usada na criação das larvas de *G. mellonella*. Essa dieta vem sendo modificada para que se torne mais barata viabilizando a multiplicação dos nematoides (Flanders, 1996; Grewal, 2002).

A produção *in vitro* iniciou 30 anos antes de Dutky (1964) ter proposto a multiplicação *in vivo*. Em 1931, Glazer cultivava NEPs em bandejas cobertas com um meio composto por vísceras de animais e dextrose-agar. Diversos meios foram testados, e com a descoberta das bactérias simbiotes deixou-se de usar as vísceras de animais de fácil contaminação e de manuseio desagradável por meios mais seguros, podendo atualmente ser feito em meios artificiais sólidos ou líquidos. O meio sólido de produção utilizado é feito, com o uso de esponja de poliuretano, embebida em meio nutritivo constituído de tecidos animais e óleo como substrato, para permitir a reprodução e o desenvolvimento do complexo nematoide-bactéria. De todas as tentativas de produção *in vitro*, a metodologia de Bedding (1981), mostrou-se a melhor, proporcionando altas produções de JIs e viabilizando a exploração comercial dos NEPs. As mudanças nos componentes de substrato vêm tornando o processo de produção de NEPs mais acessível.

O método de multiplicação de nematoides utilizando meio sólido, apesar de prático, é considerado laborioso, pois precisam ser autoclavados antes das inoculações. Além do mais, as esponjas não são biodegradáveis e descartar toneladas desse material pode ser dispendioso e danoso ao ambiente. A vantagem desse método em relação ao método *in vivo* é a maior produção de JIs em um mesmo espaço de tempo. Visando o aumento na produção e o não uso de suporte, surgiu a produção de NEPs *in vitro* em meio líquido, utilizando fermentadores do tipo tanque de 3 a 10.000 L, dessa forma produções da ordem de 90×10^3 JIs/mL tornaram-se possíveis (Minas, 2012).

Conforme Shapiro-Ilan *et. al.*, (2002), em estudo com *Steinernema carpocapsae* e *Tenebrio molitor* nematoides podem ser produzidos em massa

pelo método in vitro ou métodos in vivo. Na produção in vivo, de forma consistente altas taxas de infecção são críticas para a eficiência do processo. O número de insetos cadáveres exibindo sinais de infecção por nematoides aumenta com a concentração de nematoides e diminui com a densidade do hospedeiro por unidade de área. A produtividade é afetada pela densidade do hospedeiro.

2.3. *Heterorhabditis indica* LPP30

A linhagem LPP30 foi isolada em uma propriedade rural na cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, por meio do método do inseto armadilha, na qual foram separadas 200 lagartas vivas de *Galleria mellonella* em pares e em seguida colocadas em eppendorf de 2 ml, previamente perfurados com o auxílio de um garfo aquecido por 5 vezes para proporcionar a entrada de ar. Em seguida dois eppendorfs foram enterrados no solo em 100 orifícios com 10 X 10 cm. Após 10 dias os eppendorfs foram coletados e os que apresentaram lagartas com sintomas de infecção. As larvas foram levadas para o laboratório para isolamento e purificação da população em sucessivas infecções em lagartas de *G. mellonella* (Minas 2012).

A linhagem do nematoide entomopatogênico LPP30, conforme análise molecular das regiões de 16S e 28S bacterianas, sequências de rDNA 18S do ITS1 completa, e a região rDNA ITS2 do nematoide, foi identificada *H. indica* associado a bactérias simbiontes da espécie *Photorhabdus luminescens akhurstii*. Na temperatura de 16 °C a mortalidade das larvas de gorgulho da goiaba foi de 10%. Por outro lado, nas temperaturas entre 20 °C e 32 °C foi possível observar as maiores mortalidades variando entre 50% e 100% (Minas, 2012).

Heterorhabditis indica LPP30 apresentou uma produção de JIs expressiva, quando multiplicado em lagartas de *G. mellonella*, onde foram coletados durante 5 dias de avaliação, 1243,30 e 1296,660 de JIs em duas etapas do experimento. A produção dos JIs em lagartas de *G. mellonella* começa no 11º dia e se estende até o 21º dia, sendo o primeiro, segundo e terceiro dia de coleta os de maior produção de juvenis (Minas, 2012).

Conforme Minas (2012), a linhagem LPP30 possui capacidade de se deslocar em busca do hospedeiro (*Conotrachelus psidii*), no sentido vertical em profundidades que vão de 5 cm a 20 cm, e no sentido longitudinal, até 60 cm no

período de tempo avaliado (15 dias) e é capaz de se reciclar e permanecer no solo com a população infectiva e viável por períodos de 12 meses. Ao passo que na ausência de hospedeiro ocorre o declínio da população infectiva.

De acordo com Minas (2012), através de testes dos métodos de aplicação utilizando suspensão aquosa, esponja embebida com JIs, e inseto cadáver com e sem cápsula de gelatina, a linhagem LPP30 em meio líquido, se destacou na capacidade de causar morte em relação aos outros métodos avaliados. Quando foi utilizada a água como veículo de transporte foi obtido resultado superior em relação aos outros métodos, com mortalidade entre 86% e 87% nas áreas convencionais e orgânicas, respectivamente. O segundo melhor método foi a utilização de esponjas embebidas com nematoides ocasionando mortalidade das larvas de *C. psidii* variando entre 71% e 73% nas áreas orgânica e convencional. A utilização de lagartas somente infectadas também apresentou bons resultados entre 65% e 60% nas áreas orgânica e convencional. A metodologia, utilizando lagartas infectadas e protegidas por cápsula de gelatina, na situação do trabalho não apresentou resultado eficiente (entre 40% e 35% nas áreas orgânica e convencional).

Segundo Dolinski (2007) produções variando entre 100 e 150 mil juvenis são encontradas para o *Heterorhabditis baujardi* LPP7. Desta forma, à produção acumulada de JIs de 1.296.660, ser expressiva, o *H. indica* LPP30 possui potencial para ser usado em controle biológico, apresentando maiores mortalidades nas temperaturas entre 28 °C e 32 °C. Ressalta-se que com concentração de 850 e 1000 JIs é capaz de controlar 100% das larvas de *C. psidii.*, considerando tempo de exposição das larvas de *C. psidii* ao JIs de *Heterorhabditis indica* de 60 horas e 72 horas (Minas, 2012).

2.4. Aplicação dos nematoides entomopatogênicos

Os NEPs podem ser aplicados por pulverização, por irrigação e por cadáveres de insetos. A eficácia da aplicação demanda o desenvolvimento de sistemas que integrem o tipo de formulação, o equipamento e o método de aspersão. A dosagem correta e um tamanho adequado de gota são necessários para uma aplicação correta (Grewal, 2002).

A microaspersão do nematoide *Heterorhabditis* sp. na superfície do solo foi mais efetiva do que quando adicionada na irrigação por gotejamento (Curran, 1992). Estudos em campo têm mostrado a necessidade de se aplicar os NEPs com uma maior quantidade de água, para que os mesmos não sofram dessecação (Curran, 1992). O sistema de aspersão necessita que as telas e os filtros dos equipamentos permitam que os nematoides passem através deles. Assim, uma solução recomendável é retirar os filtros e as telas dos equipamentos, após realizar a calibração necessária do equipamento. A espécie *S. carpocapsae* pode passar através de telas tão finas como 100 micrômetros de diâmetro, contudo espécies maiores como *S. glaseri* Steiner e *H. megidis* Poinar necessitam de telas com aberturas maiores (Grewal, 2002).

Estudos com diferentes tipos de formulações têm sido testados para serem aplicados nos insetos cadáveres infectados com as diferentes espécies de nematoides entomopatogênicos para amenizar a influência de fatores abióticos nos JIs que estão sendo realizados. O tipo de formulação depende da forma como os nematoides são produzidos e a disponibilidade do material (Georgis, 1990a).

As formulações podem ser formadas por nematoides ativos, com mobilidade reduzida, ou em anidrobiose parcial (Dolinski *et al.*, 2006). A característica de anidrobiose permite gerar formulações com maior tempo de prateleira, como é o caso dos grânulos solúveis em água (Grewal, 2002). Existem também as formulações nas quais os nematoides são levados ao campo em insetos cadáveres (Dolinski *et al.*, 2006). Os cadáveres de insetos infectados proporcionam aos NEPs uma maior dispersão no solo, infectividade e sobrevivência dos JIs quando comparados à aplicação em suspensão aquosa (Shapiro-Ilan *et al.*, 2003). Esta forma de aplicação de NEPs demanda baixo investimento e tecnologia. Larvas de *Galleria mellonella* podem ser criadas, infectadas e aplicadas pelos produtores subsuperficialmente ao solo.

2.5. Coberturas protetoras de cadáveres

Danos físicos em cadáveres de insetos hospedeiros infectados por nematoides entomopatogênicos (NEPs) são frequentes durante a manipulação e aplicação desses para controle biológico de pragas agrícolas (Del Valle, 2008). insetos cadáveres podem ser formulados com coberturas protetoras visando aumentar a facilidade de manuseio e aplicação, evitando-se assim, os danos físicos provocados pela fricção e a ruptura dos cadáveres (Shapiro *et. al.*, 2001). Adicionalmente, as coberturas podem atuar minimizando o estresse do nematoide gerado por condições adversas no ambiente (Hussaini *et. al.*, 2004). Ao colocar cadáveres infectados no solo em vez de aplicar diretamente os nematoides entomopatogênicos sobre a superfície do solo, evita-se a dessecação e inativação pelos raios ultravioleta dos mesmos (Ansari *et. al.*, 2009).

Coberturas com calcário podem alterar o ambiente ao redor dos cadáveres, evitando a proliferação de microrganismos que compõem a biota do solo e pelo efeito osmótico gerado. Enquanto, talcos comerciais contêm enxofre em sua composição química, de ação fungicida (Williams & Cooper, 2004). Del Valle *et al.*, (2009) em seu trabalho com cadáveres infectados com *H. baujardi* LPP7 cobertos com calcário comercial, talco e cápsulas de gelatina, verificaram que o número de JIs extraídos das amostras procedentes de insetos cadáveres formulados com talco em pó ($9721,6 \pm 1382,3$) e em cápsulas de gelatina ($7892,0 \pm 1072,4$) não apresentou diferenças em relação à testemunha ($6346,4 \pm 1310,7$), indicando que essas coberturas não interferem na emergência dos JIs. Contudo, a cobertura com calcário em pó afetou negativamente a emergência dos JIs. Ressalta-se ainda que uma elevada infectividade foi observada nos JIs emergidos das diferentes coberturas analisadas.

2.6. Biopolímeros

2.6.1. Pectina

A pectina é um importante polissacarídeo constituinte das paredes celulares de plantas, que pode ser obtida a partir de resíduos vegetais e frutas (Laufenberg *et al.*, 2003; Kliemann, 2006). É formada por homogalacturona consistindo de alfa-D-resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas alfa-(1,4). Em muitas pectinas ocorrem naturalmente muitos grupos metil esterificados. A pectina também contém um açúcar neutro (galactose e arabinose), estes ocorrem em cadeias ligadas a raminogalacturona, porção dorsal da pectina, conforme mostrado na Figura 1 (Fishman *et al.*, 2000).

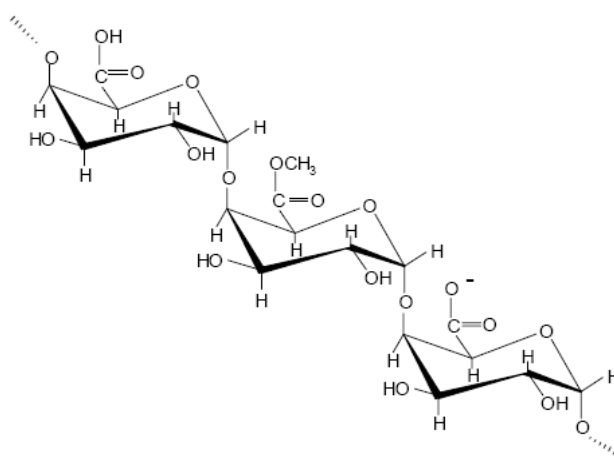


Figura 1: Estrutura química da cadeia de pectina em conformação cadeira. Fonte: Hourdet e Muller (1991).

As pectinas podem geleificar através de dois mecanismos. As de alto grau de esterificação, ou seja, as que possuem mais de 50% de grupos carboxílicos esterificados requerem uma concentração relativamente alta de sólidos solúveis, por exemplo, a sacarose, e um baixo pH. Ao contrário, as de baixo grau de esterificação, ou seja, valor inferior a 50% de grupos carboxílicos esterificados requerem apenas a presença de cátions divalentes para haver a interação entre as cadeias e a formação do gel (Camargo *et al.*, 2007).

Segundo Fertonani *et al.*, (2006), a pectina vem sendo descrita como uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos. O bagaço industrial da maçã, depois de ser lavado visando à maximização dos compostos solúveis, fica com a pectina na sua forma insolúvel, como protopectina, ainda ligada à parede celular da fruta.

As substâncias pécicas são degradadas pelas pectinases, que formam um grupo de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Elas podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Uenojo e Pastore, 2007).

Marcon *et. al.*, (2005), extraíndo pectina da farinha da maçã, constataram que o aumento no rendimento era diretamente correlacionado com o aumento no tempo e na temperatura de extração. Ressalta-se que o processo de isolamento pode influenciar na estrutura e na propriedade de polissacarídeos, de modo que as condições de extração têm um importante efeito sobre o aspecto da pectina extraída da farinha de maçã.

Fertonani *et. al.* (2006), constataram que o bagaço de maçã apresenta composição química dependente do processo de obtenção (tipo de moagem e processo de extração dos sólidos solúveis) e de beneficiamento (tempo e temperatura de desidratação). Durante o processo de extração, à medida que os polissacarídeos precipitáveis em álcool estão sendo extraídos, eles estão também sendo degradados ou desesterificados, levando à obtenção de pectinas de baixos pesos moleculares ou baixos graus de esterificação.

2.6.2. Polietileno glicol (PEG)

O Polietileno glicol (PEG) é um polímero derivado do etilenoglicol. Está disponível em várias massas molares, apresenta ótima solubilidade em água, é biodegradável e não tóxico (Harris, 1992). Pode ser classificado também como um surfactante não-iônico, e empregado como cossolvente para inúmeros fármacos (Chaudhari *et. al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005).

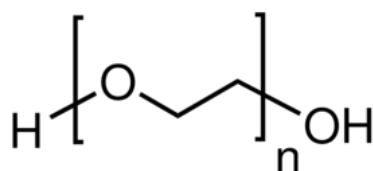


Figura 2: Estrutura química da cadeia de polietileno glicol. Fonte: SIGMA (2012).

O polietileno glicol (PEG-8000) é um polímero de condensação de óxido de etileno e de água e é suscetível à degradação oxidativa, na presença de ar (Figura 2). Minimização da exposição de PEG em níveis elevados de temperaturas e / ou exposição ao oxigênio, ou à adição de um antioxidante pode limitar a quantidade de degradação. Ressalta-se que PEGs não hidrolisam ou se deterioram durante o armazenamento e não suportam o crescimento de fungos (SIGMA, 2012).

Segundo SIGMA (2012), o PEG-8000 é solúvel em água (aproximadamente 630 mg/ml, 20 °C). Contudo, é também solúvel em muitos solventes polares tais como acetona, álcoois e solventes clorados, sendo insolúveis em solventes não polares tais como os hidrocarbonetos. Soluções aquosas de PEG 8-000 são estáveis em temperatura ambiente. As ligações de PEG não são hidrolisadas sob estas condições. Ressalta-se que a dissolução desse polímero pode ser realizada em água morna (80-90 ° C), sem efeitos adversos (SIGMA, 2012).

Segundo Korbes & Droste (2005), o polietileno glicol (PEG-8000) pode ser utilizado como regulador osmótico no crescimento somático durante a embriogênese somática na produção de células-alvo para a transformação genética da soja.

O PEG tem provado ser um osmótico importante na fase de maturação das diferentes espécies do gênero *Picea*. Atua como um agente antiplasmólise osmótica. Suas moléculas grandes não são capazes de passar através da parede celular, levando a uma restrição de absorção de água e a uma redução da pressão de turgescência e um potencial osmótico intracelular negativo (Misra *et. al.*, 1993).

Conforme Medeiros & Kanis (2010), o PEG tem potencialidade para utilização na obtenção de extratos vegetais líquidos, devido à capacidade do PEG de reduzir a constante dielétrica do líquido extrator. Verificaram que os extratos de *Mikania glomerata* Spreng., (Asteraceae), e *Passiflora edulis* Sims, (Passifloraceae), obtidos empregando PEG apresentaram teor de marcador químico e eficiência de extração semelhante àqueles obtidos pelo solvente hidroetanólico, com a vantagem de serem isentos de etanol.

Segundo Misra *et. al.* (1993) o polietileno, por exemplo, pode ser usado na maturação osmótica de células embriogênicas de sementes devido ao seu potencial osmótico, evitando a plasmólise da célula. Conforme Korbes e Droste (2005), o PEG-8000 pode ser utilizado como regulador osmótico no desenvolvimento de embriões somáticos de soja. Ressalta-se ainda que segundo Medeiros e Kanis (2010), os polietilenoglicóis (PEG) são polímeros hidrossolúveis capazes de reduzir a constante dielétrica de solventes como a água, dessa forma apresenta potencialidade de utilização para obtenção de extratos vegetais líquidos, visto que este possui a capacidade de reduzir a constante dielétrica do líquido extrator.

2.6.3. Carragenina

A carragenina ou carragenano é um biopolímero extraído de algas vermelhas (*Rhodophyceae*) capaz de formar géis e emulsões. Existem três principais tipos de carrageninas que diferem apenas no número de grupos sulfônicos (Langendorff *et. al.*, 2000; Lizarraga *et. al.*, 2006; CP Kelco, 2012).

A carragenina é extraída com água, sob condições neutras ou alcalinas a uma temperatura elevada. A Kappa-carragenano forma géis firmes, na presença de íons de potássio. A Iota-carragenano forma géis elásticos e fluidos tixotrópicos, na presença de íons de cálcio e a Lambda-carragenano, forma soluções viscosas não gelificante (CP Kelco, 2012).

2.6.4. Alginato de sódio

Os alginatos são substâncias naturais extraídos de algas castanhas e são compostas de ácido 1-4 D-manurônico (M) e ácido L-gulurônico (G) (Allen, 1963). Na cadeia polimérica, os monómeros são dispostos alternadamente em MM, GG e forma blocos MG. A composição química e sequência do M e blocos G dependerá da fonte biológica de crescimento, e das condições sazonais. Devido às suas particulares propriedades coloidais de alginatos são utilizados como películas biopoliméricas formando potencial para o revestimento de substâncias diferentes (Rhin, 2004). Para produzir o gel que é usado na formação dos filmes,

o alginato deve reagir com cátions polivalentes, sendo os íons de cálcio os agentes gelificantes mais efetivos (Allen, 1963).

O mecanismo de gelificação é um processo de troca iônica, no qual o sódio do alginato é trocado com o cálcio presente no meio gelificante através de uma ligação química entre dois grupos carboxila presentes em resíduos de ácido poligulurônico adjacentes. Os íons de cálcio têm por função manter as cadeias de alginato juntas pelas interações iônicas após a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias, produzindo gel com estrutura de rede tridimensional (King, 1983).

As películas de alginato de sódio são formadas pela dispersão do pó em água sob agitação e com aquecimento (70 °C), sendo sua gelificação dependente da quantidade de cálcio presente ou adicionada ao alimento. O íon de sódio (Na^+) do alginato sofre permutação permitindo a formação de ligações iônicas cruzadas com o íon cálcio (Ca^{+2}) presente no meio gelificante. Esta permutação permite a formação de uma estrutura mais coesa promovendo uma fixação do filme na superfície do alimento. Estas coberturas são impermeáveis a óleos e gorduras (Whistler *et.al.*, 1984).

3. TRABALHOS

TRABALHO 1

SOLUBILIDADE DE FORMULAÇÕES PROTETORAS DE CADÁVERES DE *Galleria mellonella* INFECTADOS COM *Heterorhabditis indica*

RESUMO

Atualmente um dos desafios para ampliar a utilização dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) é conseguir uma forma de aplicação que seja capaz de distribuir nematoides homogeneamente, com qualidade e quantidade e que os

custos do processo não sejam altos para que este fator não constitua um ponto limitante para uso. Nos últimos anos o uso de NEPs no controle de pragas tem aumentado e eles vêm demonstrando seu potencial como biocontroladores de insetos pragas e estão sendo considerados uma ferramenta efetiva. Desta forma, objetivou-se testar a capacidade de dissolução das formulações feitas a partir de pectina, polietileno glicol, carragenina e alginato de sódio para cadáveres de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Foram elaboradas soluções a base de pectina (2, 4, e 6%), carragenina (1, 2,5, e 5%), polietileno glicol (50, 100 e 200%) e alginato de sódio (1,5 e 3%) para produção dos filmes das coberturas. Dissolveu-se a pectina, a carragenina e o polietileno glicol em água destilada, aquecendo-se a solução em micro-ondas. Enquanto, o alginato de sódio foi dissolvido em água deionizada e polimerizado com cloreto de cálcio. As formulações foram colocadas individualmente em cada cadáver. Testou-se a melhor condição de secagem colocando os cadáveres com cobertura de cada tratamento na BOD (25 °C e 100 %UR) e na bancada em condições ambiente por 48 horas e verificou-se o comportamento dessas coberturas em contato com a areia. Conclui-se que as formulações a base de pectina (6%), carragenina (5%), polietileno glicol (200%) e alginato de sódio (1,5 %) foram as que melhor propiciaram a formação da cobertura para proteção dos cadáveres de *Galleria mellonella* com secagem em bancada à temperatura ambiente e que somente a cobertura de polietileno glicol dissolveu-se por completo quando colocada em contato com a areia umedecida.

ABSTRACT

Actually one of the challenges to extend the use of entomopathogenic nematodes (NEPs) is to achieve a form of application to be able to distribute homogeneously nematodes, quantity and quality and process costs are not high for this factor does not constitute a limiting point for use. In recent years the use of

NEPs in pest control has increased and they see demonstrating its potential as a biocontrol of insect pests and are considered an effective tool. Thus, this study aimed to test the ability of dissolving formulations made from pectin, polyethylene glycol, carrageenan and sodium alginate for corpses of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) infected with *Heterorhabditis indicatus* LPP30 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Were prepared based solutions of pectin (2, 4, and 6%), carrageenan (1, 2.5, and 5%), polyethylene glycol (50, 100 and 200%) and sodium alginate (1.5 to 3 %) for the production of films of toppings. Dissolved pectin, carrageenan and polyethylene glycol in distilled water by heating the solution in a microwave. While sodium alginate was dissolved in deionized water and polymerized with calcium chloride. The formulations were individually placed in each body. We tested whether the best drying condition placing the corpses with coverage of each treatment in BOD (25 0C and 100% RH) and on the bench at ambient conditions for 48 hours and found the behavior of these coverages in contact with the sand. It is concluded that the pectin based formulations (6%), carrageenan (5%), polyethylene glycol (200%) and sodium alginate (1.5%) had better favored the formation of protective cover for the bodies *Galleria mellonella* with countertop drying at room temperature and only cover polyethylene glycol dissolved completely when placed in contact with moist sand.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência na utilização de insetos cadáveres pode ser aumentada mediante coberturas protetoras. Os insetos cadáveres com coberturas são protegidos de danos físicos derivados da manipulação e aplicação e, dependendo do tipo de cobertura, pode até resguardar os mesmos de condições adversas do ambiente (Hussaini *et. al.*, 2004; Del Valle *et. al.*, 2009).

Os nematoides podem permanecer ativos, com mobilidade reduzida, ou em anidrobiose parcial às formulações. A característica de anidrobiose permite

gerar formulações com maior tempo de prateleira, como é o caso dos grânulos solúveis em água (Grewal, 2002). Existem também as formulações nas quais os nematoides são levados ao campo em insetos cadáveres (Shapiro-Ilan et al., 2001).

Segundo Georgis *et. al.* (1995), a aplicação dos NEPs tem contado com diversas formulações, incluindo carvão ativado, géis de poliacrilamida, argilas, esponjas de poliuretano e vermiculita, capazes de aumentar a persistência dos nematoides devido a uma redução no metabolismo e imobilização, acompanhada ou não por refrigeração do produto ou dessecação parcial dos juvenis infectantes.

Shapiro-Ilan *et. al.* (2010) trabalhando com cadáver de *Tenebrio molitor* infectados por *Heterorhabditis indica* Poinar e *Steinernema carpocapsae* desenvolveram uma máquina de embalagem automática, para reduzir o trabalho e padronizar o produto final. Concluíram que o método tem a vantagem de produção em massa facilitada pela máquina, mas oferece uma opção para aplicação manual.

Ansari *et. al.*, (2009) em estudos com cadáveres infectados com *S. glaseri* e *H. bacteriophora* utilizando uma solução de imersão de (amido de batata, água destilada e caolin), bentonite, terra de diatomáceas, “fuller’s earth” na cobertura, verificaram que o agente de imersão revestiu a superfície do cadáver infectado e serviu como um adesivo para o pó, o qual por sua vez, impediu os cadáveres de colar. Este passo de dois procedimentos se destinou a fornecer cadáveres com uma estrutura firme evitando a ruptura. Verificaram diferenças na ligação de pós-inertes. No geral, a combinação caulino-amido provou ser a mais estável, além de ficar bem aderido aos cadáveres não sufocou os JIs. Os outros pós-inertes não ficaram nos cadáveres (“fuller’s earth”) ou racharam após a aplicação (terra de diatomáceas e bentonite). Assim, o estudo demonstrou que um revestimento de caulino-amido proporcionou uma maior preservação dando proteção superior aos cadáveres e não afetou o potencial reprodutivo e a virulência de nematoides.

Objetivou-se determinar as melhores condições de secagem e testar a capacidade de dissolução das formulações feitas a partir de pectina, polietileno glicol, carragenina e alginato de sódio em cadáveres de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida: Heterorhabditidae).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

2.2. Nematoides entomopatogênicos e insetos cadáveres

Heterorhabditis indica LPP30 foi originalmente isolado de uma lavoura comercial de goiaba em Campos dos Goytacazes RJ-Brasil, por meio do método do inseto armadilha, na qual foram separadas 200 lagartas vivas de *Galleria mellonella* em pares e em seguida colocadas em eppendorfs de 2 ml, previamente perfurados com o auxílio de um garfo aquecido por 5 vezes para proporcionar a entrada de ar. Em seguida dois eppendorfs foram enterrados no solo em 100 orifícios com 10 X 10 cm. Após 10 dias os eppendorfs foram coletados e os que apresentaram lagartas com sintomas de infecção. As larvas foram levadas para o laboratório para isolamento e purificação da população em sucessivas infecções em lagartas de *G. mellonella* (Minas, 2012). A produção dos juvenis infectantes (JIs) foi feita *in vivo* mediante a colocação dos juvenis infectantes em contato com as larvas de *Galleria mellonella* (Figura 1a e 1b). Foi utilizada uma solução volumétrica de JIs em água destilada, sendo colocado 0,5 mL dessa solução com as larvas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro (Whatman N°1) na base e incubadas em câmara de germinação a 25 °C e 80 % de umidade. Após sete dias, os cadáveres com sintomatologia típica de infecção (Figura 1c) foram colocados em armadilhas de White modificadas (White, 1927) (Figura 1d). Os JIs foram coletados das armadilhas durante 6 dias e armazenados em água destilada nas garrafas de cultura de células de 250 mL por no máximo uma semana a 16 °C antes da utilização.

Os insetos cadáveres foram obtidos pela exposição de larvas no sétimo instar de *G. mellonella* a juvenis infectantes de *H. indica* LPP30. As larvas

apresentaram em média 250 mg de massa (Figura 1a). Após quatro dias, os cadáveres que apresentaram coloração marrom avermelhada, sintomatologia típica da infecção por *Heterorhabditis*, foram transferidos para outra placa de Petri com papel filtro (Whatman N°1) na base e incubados novamente na câmara de germinação até o sexto dia quando receberam o filme de cobertura.

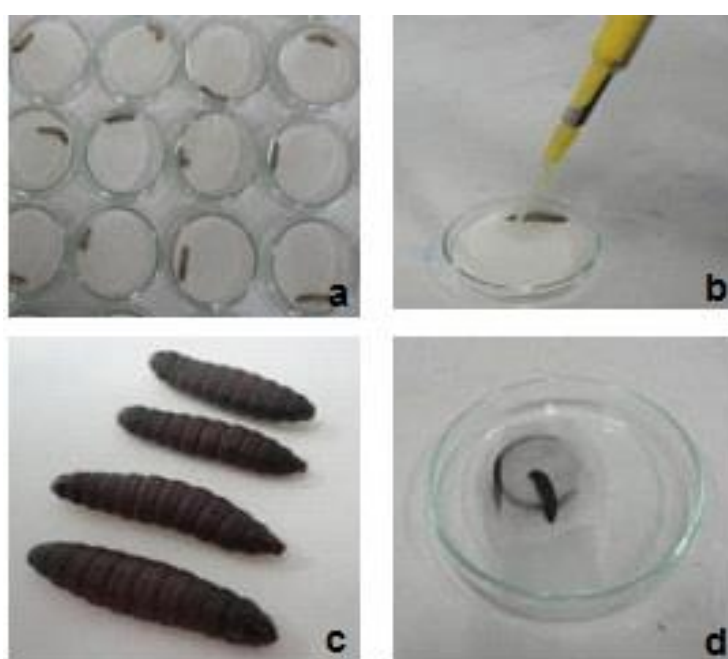


Figura 1: Multiplicação de *Heterorhabditis indica* LPP30. *Galleria mellonella* (a), infecção de *Galleria mellonella* (b), Armadilha de White (d).

2.3. Elaboração dos filmes de cobertura para os insetos cadáveres

Foram testadas concentrações para as formulações das coberturas dos cadáveres utilizando 20 cadáveres para cada tratamento e quatro substâncias base para as formulações (pectina, carragenina, polietileno glicol e alginato de sódio). Ressalta-se que um grupo de 20 cadáveres foi mantido sem cobertura para servir de controle.

Nessa primeira fase para elaboração do filme foram testadas formulações com pectina de 2, 4 e 6% (p/v), com carragenina de 1, 2.5 e 5% (p/v) e com polietileno glicol, de 50% e 200% (p/v). A concentração de alginato de sódio foi de 1,5 e 3% (p/v) devido a concentrações mais elevadas apresentarem dificuldade em dissolução (Figura 2).

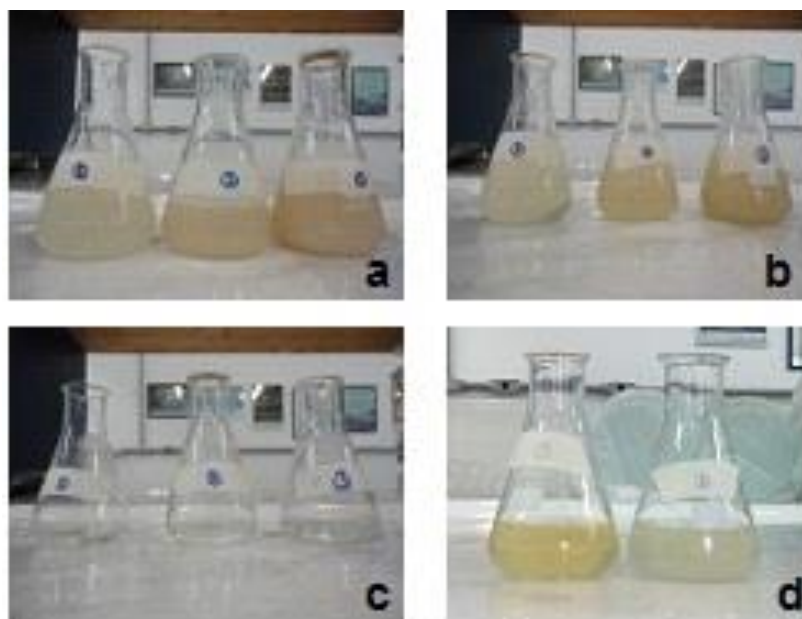


Figura 2: Soluções utilizadas na formulação de cadáveres de *Galleria mellonella* (Pectina (a), carragenina (b) e polietileno glicol (c), alginato (d)).

As soluções de pectina, carragenina e polietileno glicol foram elaboradas em água destilada e com aquecimento em micro-ondas por 120, 90 e 60 segundos, respectivamente. Após a mistura estar homogênea o recipiente com a formulação foi colocado em condições de laboratório sobre a bancada para esfriar até atingir temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). Após a solução foi colocada sobre os cadáveres individualmente com o auxílio de uma pipeta pasteur (Figura 3, 4, 5, 6). Foram usados 2 mL das soluções de pectina e carragenina e 1 mL da solução de polietileno glicol. A solução de alginato foi preparada em água deionizada sob agitação constante em chapa agitadora para depois ser utilizada no preparo do biofilme usando-se o cloreto de cálcio para a polimerização. O biofilme de alginato de sódio foi preparado com o gotejamento de 3 mL de cloreto de cálcio em 3 mL da solução de alginato. Após 60 segundos o filme preparado foi colocado sobre o cadáver e então colocado na bandeja para secar.

Os 20 cadáveres de cada tratamento foram colocados em bandejas na bancada em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), e deixados até secarem e desprenderem da bandeja.



Figura 3: Formulação para cadáveres de *Galleria mellonella* (pectina 2% (a), 4% (b), 6% (c); carragenina 1% (d), 2.5% (e), 5% (f); polietileno glicol 50% (g), 100% (h) e 200% (i)).

Na segunda fase de elaboração das coberturas testou-se duas condições de secagem da cobertura dos cadáveres, sendo uma em condições controladas usando câmara de germinação a 25 °C (BOD) e em condições de laboratório sobre a bancada. Utilizou-se para isso quatro tipos de soluções base (pectina, carragenina, polietileno glicol e alginato de sódio), as quais foram consideradas mais adequadas na primeira fase do experimento e 50 cadáveres para cada tratamento. Ressalta-se que um grupo composto por 100 cadáveres sem cobertura foi separado para servir de controle. Foram preparadas soluções de pectina 6%, carragenina 5%, polietileno glicol 200% e o filme alginato de sódio a 1.5%, segundo o explicado previamente.

Foram levados em bandejas 50 cadáveres de cada tratamento para a BOD e colocados na bancada em condições de laboratório (25 °C ± 2) para secagem. O tempo estabelecido para ambas as condições propostas para secagem das formulações foi de 48 horas. Durante esse tempo realizou-se duas observações, durante um intervalo de 24 horas.

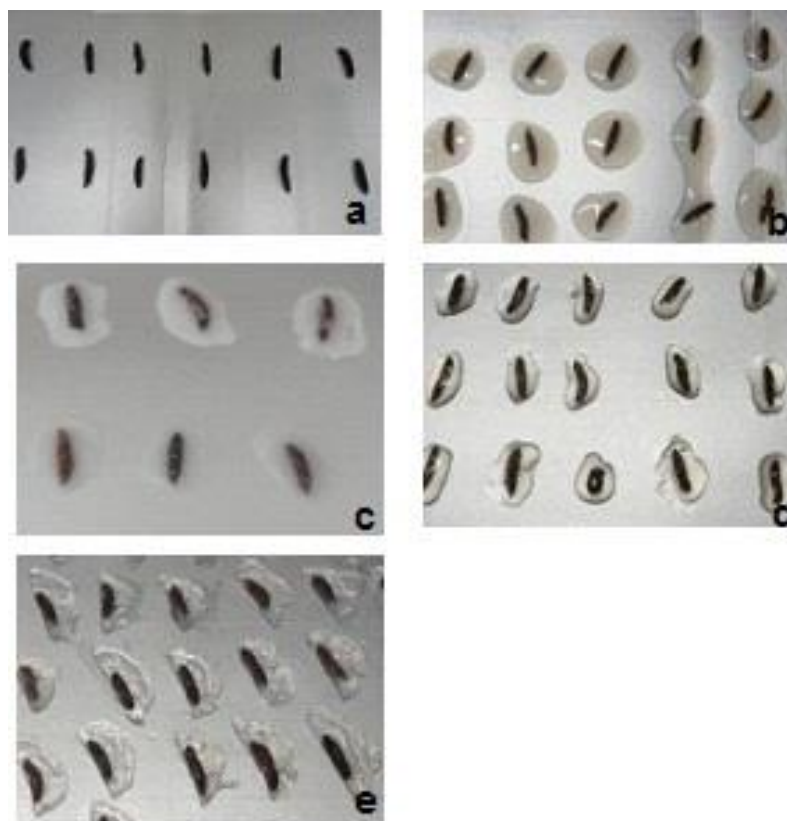


Figura 4: Teste de secagem das formulações de cadáver de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30 em BOD e em bancada (Controle (a); pectina (b); polietileno glicol (c); carragenina (d) e Alginato de sódio (e)).

2.4. Teste de solubilidade das películas em areia

Foram avaliadas as substâncias anteriores em areia com quatro tipos diferentes de umidade (0%, 10%, 20% e 30%). Utilizou-se para isso 16 potes plásticos de 500 mL com 300 ml de areia solarizada. Foram colocados em 12 dos potes água destilada na proporção de 10%, 20% e 30% em grupos de 4 por cada tratamento. Ressalta-se que um grupo de 4 potes foi separado sem adição de água, somente com a umidade inicial da areia. Foram adicionados em cada pote 10 larvas de *Galleria Mellonella* de cada cobertura sobre a superfície da areia (Figura 5a). Os 16 potes foram tampados para reduzir a perda de água (Figura 5b). Após 48 horas foi feita a avaliação visual das coberturas. Avaliou-se também a infectividade dos JIs emergidos, para tal 2 dias depois adicionou-se em cada pote um envelope de tela medindo 5 cm de comprimento por 5 cm de largura contendo duas larvas de *G. mellonella*. Os envelopes foram colocados enterrados na areia (Figura 5a e 5c). As telas foram deixadas por 72 horas nos potes e depois levadas para a BOD. Observou-se as larvas por mais 72 horas, a fim de verificar a ocorrência de sintomatologia típica da infecção por *H. indica* LPP30. O teste foi repetido com 15 dias.



Figura 5: Potes contendo solo umedecido ou não, adicionados de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30 cobertos por diferentes formulações. Aspectos do experimento montado (a e b), envelope de tela contendo lagartas de *G. mellonella* vivas para serem usadas como iscas (c).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Elaboração dos filmes de cobertura para os insetos cadáveres

Nosso trabalho demonstrou que as diferentes concentrações de pectina 2, 4 e 6% (p/v), carragenina 1, 2.5 e 5% (p/v), polietileno glicol (50% e 200% (p/v)) e alginato de sódio a 1,5 e 3% (p/v) são capazes de proporcionar a formação de um invólucro ao redor do cadáver. Verificamos que as melhores concentrações foram pectina a 6%, carragenina a 5%, polietileno glicol a 200% e alginato de sódio a 1.5%. As concentrações mais baixas de pectina (2%), carragenina (1%) e alginato de sódio (1,5%) apresentavam rachaduras e não desprende da superfície, o que dificultou a liberação do cadáver sem sofrer dano. Indicando que o uso das concentrações menores na formulação não é viável por não propiciar a proteção esperada ao cadáver

A formulação à base de pectina 1% demonstrou alta fluidez ficando a maior parte sobre a superfície (Figura 6a). A formulação com pectina 3% apesar de mais densa que a 1%, ao ser aplicada no cadáver também escorreu acumulando-se na superfície suporte (Figura 6b). Já a formulação com pectina 6% foi a mais densa das concentrações testadas e quando aplicada no cadáver parte da formulação permanece ao redor do cadáver possibilitando a formação do invólucro. Ao secar essa formulação permitiu que o cadáver se desprendesse da superfície, além de proporcionar uma maior rigidez a estrutura do cadáver (Figura 6c).

A formulação a base de polietileno glicol nas concentrações de 50 e 100% apesar de apresentarem a formação de uma camada na superfície mantiveram no seu interior a solução em seu estado líquido em contato com o cadáver (6g e 6h). A formulação com polietileno glicol 200% foi mais apropriada para fornecer uma cobertura protetora aos cadáveres, visto que material já apresentou cristalização nas primeiras horas após ser colocado sobre o cadáver e no fim das 48 horas o material encontra-se seco (Figura 6i).

A formulação a base de carragenina 1% proporciona um fino filme sobre o cadáver, contudo o filme é quebradiço e não se desprende da superfície ao secar (Figura 6d). A formulação com carragenina 2,5% proporcionou uma

cobertura firme, porém quebradiça se desprendendo parcialmente da superfície (Figura 6e). O invólucro proporcionado pela formulação com carragenina 5% apresentou-se firme dando mais rigidez ao cadáver e se despreendeu da superfície após seco (Figura 6f). Ressalta-se que concentrações superiores a 5% ao serem aquecidas formam uma solução extremamente densa que ao esfriar a temperatura ambiente se solidifica rapidamente impossibilitando a aplicação nos cadáveres.

Baseado nos resultados observa-se que ambas as formulações são capazes de formar uma cobertura no cadáver de *G. mellonella* quando colocados em condições de laboratório para secagem (Figura 7). No entanto, constatou-se que a película protetora não é formada quando os insetos cadáveres são levados a BOD por 48 horas. As formulações de pectina, polietileno glicol e carragenina não secam, pelo contrário se dissolvem como se pode observar nas Figuras 8b, 8c, 8d. O filme de alginato de sódio apesar de não sofrer liquefação também não formou filme (Figura 8d). As coberturas de pectina, polietileno glicol e carragenina estavam mais fluidas que no início do armazenamento. O filme de alginato ainda permanecia úmido.

Acredita-se que esse comportamento apresentado pelas coberturas é devido à presença de umidade dentro da câmara de germinação. Os materiais teriam absorvido a água presente no ambiente, o que ocasionou uma diluição dos filmes de pectina, polietileno glicol e carragenina e uma hidratação no filme de alginato de sódio. Esse comportamento pode ser devido à capacidade hidrofílica das soluções causando uma absorção de água e uma maior hidratação das mesmas impedindo a secagem do hidrogel. (Whistler *et. al.*; 1984; Langendorff *et. al.*, 2000; Medeiros e Kanis, 2010; Camargo *et. al.*, 2007).

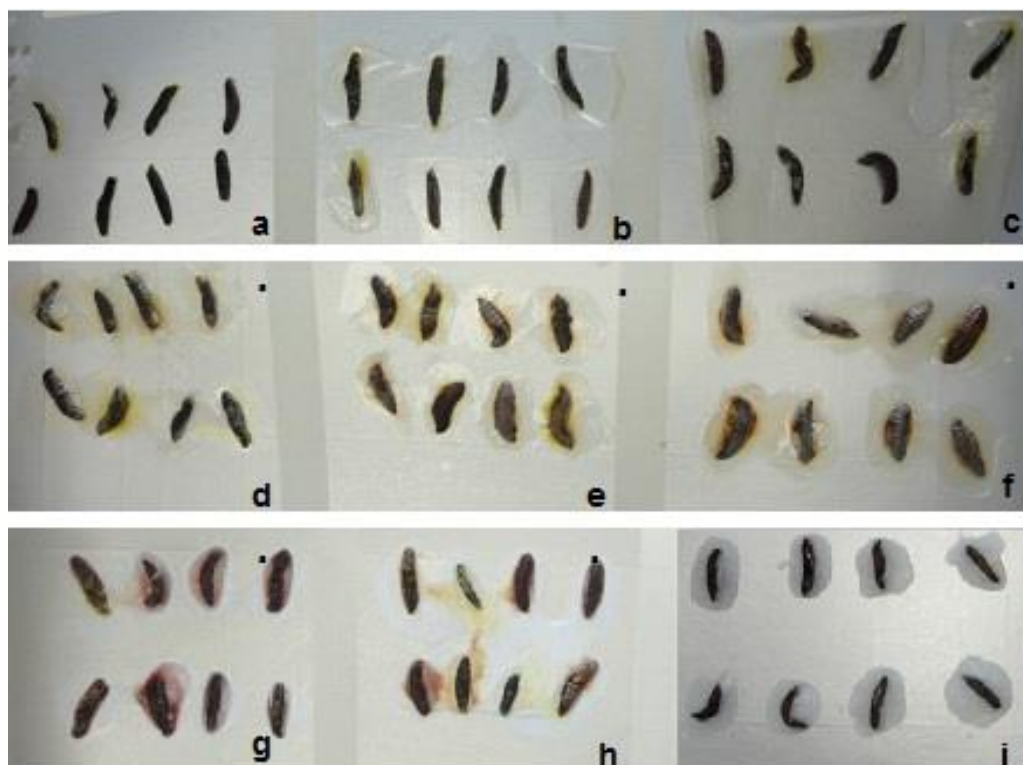


Figura 6: Formulação para cadáveres de *Galleria mellonella* (pectina 2% (a), 4% (b), 6% (c); carragenina 1% (d), 2.5% (e), 5% (f); polietileno glicol 50% (g), 100% (h) e 200% (i)).

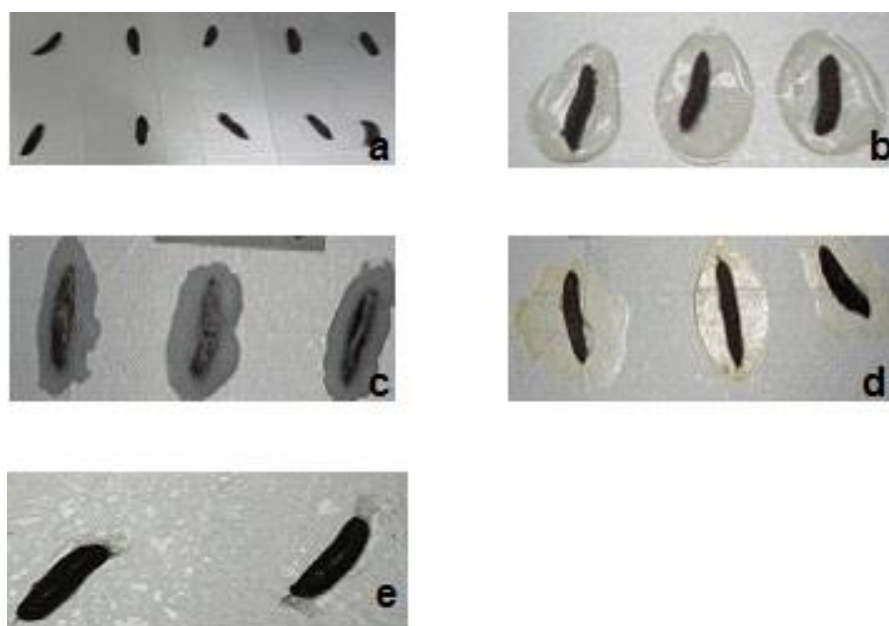


Figura 7: Formulação de cadáver de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30 secos em bancada (Controle (a); pectina 6% (b); polietileno glicol 200% (c); carragenina 5% (d) e Alginato de sódio 3% (e)).

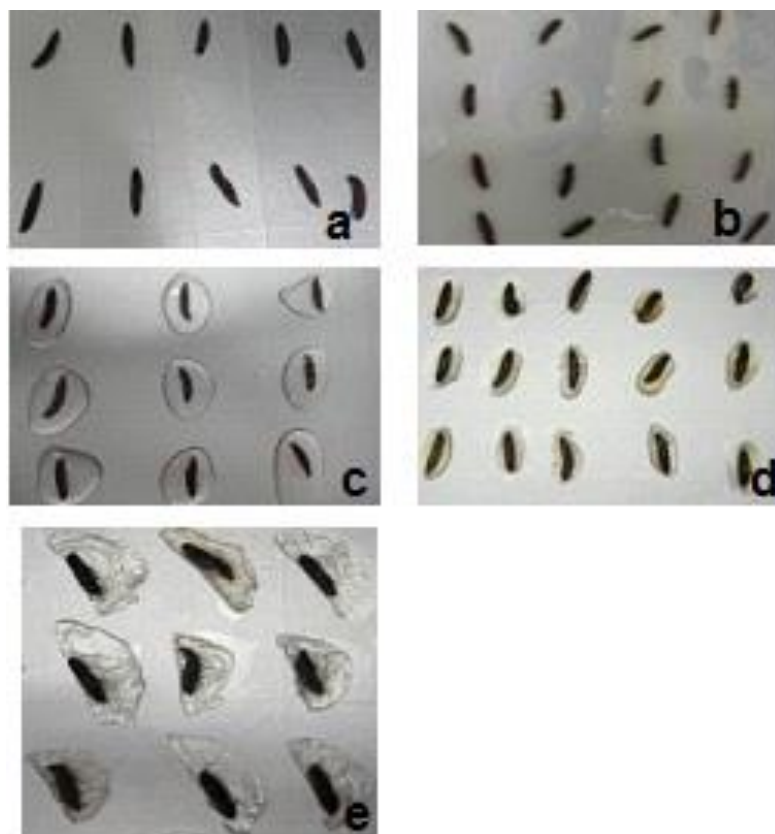


Figura 8: Formulação de cadáver de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30 colocados na BOD por 48 horas (Controle (a); pectina 6% (b); polietileno glicol 200% (c); carragenina 5% (d) e Alginato de sódio 3% (e)).

3.2. Teste de solubilidade

Baseado nos resultados observa-se que a cobertura dos 10 cadáveres formulados a base de polietileno glicol quando em contato com o solo solubilizou-se por completo após as 48 horas nas umidades de 10%, 20% e 30%. Essa solubilização em água é importante para que os nematoides permaneçam vivos, conforme verificou Del Valle (2008), em seus estudos com cápsulas de gelatina que se dissolveram para a liberação dos nematoides.

Os 10 cadáveres que estavam no tratamento seco não apresentaram mudanças na cobertura. No entanto, os 10 cadáveres com coberturas a base de pectina, carragenina e alginato de sódio não dissolveram. Contudo, todos os cadáveres de ambas as formulações apresentaram uma reidratação e com 48 horas já se detectava a proliferação de fungos. Após 5 dias foram colocadas as armadilhas com a larvas. No entanto, no decorrer de 10 dias não ocorreu infecção de nenhuma larva em nenhum dos tratamentos, incluindo a testemunha.

A solubilização das formulações deve-se ao fato das substâncias utilizadas serem polímeros biodegradáveis hidrofílicos, característica essa que contribui para a produção de formulações ecologicamente corretas que serão desintegradas e não vão causar danos ao ambiente nem à saúde humana (Whistler *et.al.*, 1984; Misra *et. al.*, 1993; Camargo *et. al.*, 2007; Lizarraga *et. al.*, 2006;). Desta forma, devido à sua capacidade de solubilização, poderiam ser possíveis matérias-primas para formulações de cadáveres, para serem aplicadas no controle biológico. Novos estudos, no entanto, devem ser realizados para possibilitar que os JIs mantenham-se vivos e infectantes.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansari, M. A. Hussain, M. A. Moens, M. Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthis* in turfgrass *Pest Manag Sci* 2009; 65: 367–374. DOI 10.1002/ps.1699
- Camargo, P.; Moraes, C.; Schemberger, A.; Santos, C.P.; Schemin, M.H.C. (2007). Rendimento da pectina da casca do maracujá em seus estádios diferentes de maturação: verde, maduro e senescência. V Semana de Tecnologia em alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Campus Ponta Grossa, Paraná, Brasil, v. 02, n. 01. ISSN 1981-366X.
- Capinera, J.L.; N.D. Epsky. (1992). Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. *Florida Entomologist*, 75: 525-532.
- Del Valle, E. E, Dolinski C, Barreto, ELS, Souza RM, Samuels RI. (2008). Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 18 (1): 33-41.
- Dolinski C., Del Valle, E.E., Stuart, R.J. (2006). Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422-427.
- (1990). Formulation and application technology. *In*: Gaugler, R., Kaya H. K. (eds) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. p. 173-194.
- Georgis, R.; Dunlop, D. B.; Grewal, P.S. (1995). Formulation of entomopathogenic nematodes. *In*: Hall, F. R., Barry, J. W. (Eds). *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197 – 205.
- Grewal, L.P.S. (2002) Formulation and application technology. *In*: GAUGLER, R. (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. CABI, Wallingford (U.K.) p. 266-284.

- Hussaini, S. S., Nagesh, M., Rajeshwari, R., Dar, M. H. (2004) Formulation of host cadavers infected with indigenous *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae: Rhabditida) isolates. *Entomon.* 29(4):339-344.
- Kaya, H. K.; Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environment Entomology.* 14: 572 -574.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. G. (2000). "Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures". *Food Hydrocolloids*, 14, 273–280.
- Minas, R.S. (2012). Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visado o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. (Tese). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ. 138p.
- Medeiros, J.; Kanis, A. L. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae (2010). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(5): 796-802.
- Navon, A.; Nagalakshmi, V. K.; Leviski, S.; Salame, L.; Glazer, I. (2002). Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopteran pests. *Biocontrol Science Technology.* 12: 737-746.
- Renn, N. (1998). The efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling housefly infestations of intensive pig units. *Medicine Veterinary Entomology.* 12: 46 – 51.
- Shapiro-Ilan, D.I.; Lewis, E.E.; Behle, R.W.; McGuire, M.R.. (2001). Formulation of Entomopathogenic Nematode-Infected Cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology.* **78**, 17–23. doi:10.1006/jipa.2001.5030
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66:302-303.
- Whistler, R. L.; Bemiller, J. N.; Paschall, E. F. *Starch chemistry and technology.* San Diego: Academic Press, 1984.

TRABALHO 2

EFEITO DE DIFERENTES COBERTURAS PROTETORAS EM CADÁVERES DE *Galleria mellonella* INFECTADOS COM *Heterorhabditis indica*LPP30

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs), nos últimos anos demonstram seu potencial como agentes biológicos para o controle de insetos pragas. Atualmente, um dos maiores problemas para a utilização dos NEPs como biocontroladores é a sensibilidade a condições ambientais extremas. Objetivou-se assim, desenvolver um invólucro que forneça proteção aos cadáveres de *Galleria mellonella* infectado por *H. indica* LPP30, que não afete a sobrevivência dos JIs e proporcione uma cobertura que forneça uma maior resistência aos fatores externos, tais como a dessecação e danos físicos. Foram elaboradas soluções a base de pectina a 6%, carragenina a 5%, polietileno glicol a 200% e alginato de sódio a 1,5% para produção dos filmes das coberturas. Dissolveu-se a pectina, a carragenina e o

polietileno glicol em água destilada, aquecendo-se a solução em micro-ondas. Enquanto, o alginato de sódio foi dissolvido em água deionizada e polimerizado com cloreto de cálcio. As formulações foram colocadas individualmente em cada cadáver. Avaliou-se progênie, infectividade dos cadáveres formulados. As análises estatísticas foram feitas usando análises de variância dos resultados (ANOVA) e diferenças nas médias dos tratamentos foram determinadas utilizando o teste de Tukey em nível de 5% de significância. Verificou-se que, 100% dos filmes elaborados com as soluções de pectina e polietileno glicol dissolveram totalmente durante o período de análise, enquanto os a base de carragenina e alginato de sódio sofreram reidratação. Observou-se que apenas ocorreu liberação de juvenis infectantes (JIs) no controle e no tratamento 3 (cadáver parcialmente coberto com pectina). As médias de JIs dos tratamentos não diferiram, contudo diferiram na réplica. Ressalta-se que a infectividade não diferiu. Conclui-se que possivelmente as coberturas causaram uma restrição no oxigênio dos nematoides interrompendo assim a reprodução e assim apesar das formulações proporcionarem uma cobertura protetora ao cadáver elas interferem na emergência dos juvenis.

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (NEPs) in recent years demonstrate its potential as biological agents for the control of insect pests. Currently, one of the biggest problems for the use of NEPs as biocontrol is the sensitivity to extreme environmental conditions. The objective is thus to develop an enclosure that provides protection to *Galleria mellonella* cadavers infected by *H. LPP30* indicates, that does not affect the survival of IJs and provides cover that provides greater resistance to external factors, such as desiccation and physical damage. Were prepared based solutions of pectin (6%), carrageenan (5%), polyethylene glycol (200%) and sodium alginate (1.5%) for the production of films of the covers. Dissolved pectin, carrageenan and polyethylene glycol in distilled water by heating

the solution in a microwave. While sodium alginate was dissolved in deionized water and polymerized with calcium chloride. The formulations were individually placed in each body. Evaluated progeny infectivity of cadavers formulated. The statistical analyzes were performed using analysis of variance results (ANOVA) and differences in treatment means were determined using Tukey's test at 5% significance level. It was found that 100% of the films prepared with the solutions of pectin and polyethylene glycol dissolved completely during the scan, while the base carrageenan and sodium alginate suffered rehydration. It was observed that there was only release of infective juveniles (IJs) in the control and treatment 3 (body partly covered with pectin). The average IJs treatments did not differ, however, differed in the replica. It is noteworthy that the infectivity did not differ. It is concluded that covers possibly caused a restriction in the oxygen interrupting nematode reproduction and so although the formulations provide a protective cover to the body they interfere with emergency juveniles.

1. INTRODUÇÃO

A sensibilidade a condições ambientais extremas dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) é um dos maiores problemas para a utilização deles como biocontroladores. Segundo Lara (2006), o nematoide *Heterorhabditis baujardi* LPP7 pode suportar temperaturas de até 35 °C sem ser afetado em sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento até larvas de *Galleria mellonella*. As temperaturas superiores a 40 e 45 °C diminuem a viabilidade de nematoides, além de prejudicar sua patogenicidade e deslocamento. Segundo Kaya (1990), a amplitude que permite o aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico é relativamente estreita e a sua infectividade e persistência é comprometida por temperaturas superiores a 30 °C e inferiores a 15 °C.

Ansari *et. al.* (2009) observaram que ao colocar cadáveres infectados no solo em vez de aplicar diretamente os nematoides entomopatogênicos sobre a

superfície do solo, evita-se a dessecação e inativação dos nematoides pelos raios ultravioleta.

A aplicação dos NEPs ao solo tem contado com diversas formulações, incluindo carvão ativado, géis de poliacrilamida, argilas, esponjas de poliuretano e vermiculita (Georgis *et. al.*, 1995). As formulações podem aumentar a persistência dos nematoides devido a uma redução no metabolismo e imobilização, acompanhada ou não por refrigeração do produto ou dessecação parcial dos juvenis infectantes (Georgis, 1990; Georgis *et. al.*, 1995). Formulações como as argilas, por exemplo, podem aumentar o tempo de atividade dos nematoides no solo depois da aplicação, protegendo os NEPs contra as condições adversas (Navon *et. al.*, 2002).

Conforme Shaphiro-Ilan *et. al.* (2002), as formulações que não são baseadas na dessecação dos nematoides, como pasta ou esponja, conseguem ter altas viabilidades, mas não podem ser guardadas em altas densidades, o que constitui uma limitação para aplicação em longa escala.

Os NEPs, nos últimos anos têm demonstrado seu potencial como agentes biológicos para o controle de insetos pragas e estão sendo considerados uma ferramenta efetiva para ser incorporada em programas de manejo integrado de pragas, representando uma parte importante dos chamados biocontroladores (Shaphiro-Ilan *et. al.* 2002).

Objetivou-se assim com esse trabalho desenvolver um invólucro que forneça proteção a cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com H. indica LPP30 com o propósito de que forneça maior resistência às condições externas e mantenham sua capacidade de multiplicação, supervivência e infectividade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

2.2. Nematoides entomopatogênicos e insetos cadáveres

Heterorhabditis indica LPP30 foi originalmente isolado de uma lavoura comercial de goiaba em Campos dos Goytacazes RJ-Brasil (Minas, 2012). A produção dos juvenis infectantes (JIs) foi feita *in vivo* mediante a colocação de seus juvenis infectantes em contato com as larvas de *Galleria mellonella*. Foi utilizada uma solução volumétrica de JIs em água destilada, sendo colocado 0,5 mL dessa solução com as larvas em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro (Whatman N°1) na base e incubadas em câmara de germinação a 25 °C e 80 % de umidade. Após sete dias, os cadáveres com sintomatologia típica de infecção foram colocados em armadilhas de White modificadas (White, 1927). Os JIs foram coletados das armadilhas durante 6 dias e armazenados em água destilada nas garrafas de cultura de células de 250 mL por no máximo uma semana a 16 °C antes da utilização.

Os insetos cadáveres foram obtidos pela exposição de larvas no sétimo instar de *G. mellonella* a juvenis infectantes de *H. indica* LPP30. As larvas foram pesadas individualmente em balança analítica (Gehaka, modelo AG 200). A produção dos juvenis infectantes (JIs) foi realizada *in vivo* mediante colocação dos JIs em contato com as larvas, utilizando aproximadamente 100 JIs em 1 mL de água destilada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro (Whatman N°1) na base e incubadas em câmara de germinação a 25 °C e 80 % de umidade. Após quatro dias, os cadáveres que apresentaram coloração marrom avermelhada, sintomatologia típica da infecção por *Heterorhabditis*, foram transferidos para outra placa de Petri com papel filtro na base (Whatman N°1) e incubados novamente na câmara de germinação até o sexto dia quando receberam o invólucro.

2.3. Elaboração dos filmes de cobertura para os insetos cadáveres

Utilizou-se para isso quatro tipos de soluções base (pectina, carragenina, polietileno glicol e alginato de sódio) e 20 cadáveres para cada tratamento. Ressalta-se que um grupo composto por 20 cadáveres sem cobertura foi

separado para servir de controle. Foram preparadas soluções de pectina 6% (p/v), carragenina 5% (p/v), polietileno glicol 200% (p/v) e o filme de alginato de sódio a 1.5% (p/v).

As soluções de pectina, carragenina e polietileno glicol foram feitas em água destilada e com aquecimento em micro-ondas por 120, 90 e 60 segundos, respectivamente. Após a mistura estar homogênea o recipiente com a formulação foi colocado em bancada para esfriar até atingir temperatura ambiente (aproximadamente 25⁰C). Após atingir temperatura de 25⁰C a solução foi colocada sobre os cadáveres individualmente com o auxílio de uma pipeta (Figura 3, 4, 5, 6). Foram usados aproximadamente 2 mL das soluções de pectina e carragenina e 1 mL da solução de polietileno glicol. Ressalta-se que no caso do tratamento da pectina utilizou-se dois sistemas para cobertura dos cadáveres. No primeiro, o cadáver foi totalmente coberto com a formulação e no segundo apenas metade do cadáver recebeu a formulação, para verificar se há interferência química da substância no processo de reprodução dos nematoides.

A solução de alginato de sódio foi preparada em água deionizada sob agitação constante em chapa agitadora e usada no preparo do biofilme. Usou-se para a polimerização cloreto de cálcio. Desta forma, preparou-se o biofilme de alginato de sódio com o gotejamento de 3 mL de cloreto de cálcio em 3 mL da solução de alginato de sódio. Após 60 segundos o filme preparado foi colocado sobre o cadáver e então colocado na bandeja.

Os cadáveres de todos os tratamentos já com as coberturas foram colocados em bandeja e deixados na bancada para secagem. Observa-se que como foram usados dois sistemas de cobertura com a formulação a base de pectina, tem-se então tratamento 1 (controle), tratamento 2 (cadáver totalmente coberto com pectina), tratamento 3 (cadáver parcialmente coberto com pectina), tratamento 4 (carragenina), tratamento 5 (polietileno glicol) e tratamento 6 (alginato de sódio). O tempo estabelecido para a secagem das formulações foi de 48 horas.

2.4. Caracterização dos insetos cadáveres

2.4.1. Progênie

As larvas com aproximadamente 300 mg de massa infectadas individualmente através da adição de 100 Jls/mL em placas de Petri (50 mm de diâmetro), com papel filtro (Whatman N°1) na base e incubadas em câmara de germinação a 25 °C e 80 % de umidade já cobertas e secas em temperatura ambiente por 72 horas foram colocadas em armadilhas de White modificadas (White, 1927). Os Jls foram coletados das armadilhas a cada 24 horas ao longo de 10 dias e foram armazenados em água destilada nas garrafas de cultura de células de 250 mL a 16 °C em câmara de germinação até a contagem dos juvenis.

A contagem foi realizada manualmente em lupa binocular com o auxílio de um contador manual, feita através de 3 micro-alíquotas de 0,1 mL e foi estabelecido o valor médio de produção final através da seguinte equação:

$$0,1 \text{ mL} * N = \frac{(n_1 + n_2 + n_3)}{3} * 10 * \text{vol (mL)}$$

Onde,

n_1 ; n_2 ; n_3 : número de nematoides em cada alíquota;

N: número de nematoides estimado para o volume inicial da solução;

Vol (mL): volume inicial da solução.

2.4.2 Patogenicidade dos Jls emergidos dos insetos cadáveres

As larvas com aproximadamente 300 mg de massa infectadas individualmente através da adição de 100 Jls/mL em placas de Petri (50 mm de diâmetro), com papel filtro (Whatman N°1) na base e incubadas em câmara de germinação a 25 °C e 80 % de umidade já cobertas e secas em temperatura ambiente por 72 horas foram colocadas em armadilhas de White modificadas (White, 1927). Os Jls foram coletados das armadilhas e foram utilizados no preparo de uma solução volumétrica para avaliação da patogenicidade.

A patogenicidade dos JIs foi avaliada após cada tratamento em larvas de sétimo instar de *G. mellonella*, para qual foram utilizadas 10 larvas por tratamento com 5 repetições. As infecções foram feitas com 100 JIs/mL de cada tratamento e a mortalidade foi avaliada 72 horas depois da infecção e sintomatologia típica da infecção por *H. indica* LPP30 confirmada sete dias depois (Lara, 2006).

2.5. Análise estatística

As análises foram feitas usando análises de variância dos resultados (ANOVA) com Sistema de Análises Estatísticas (Universidade Estadual de Viçosa, 1997). Diferenças nas médias dos tratamentos foram determinadas utilizando o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado produção de progênie somente no controle (tratamento 1) e nos cadáveres parcialmente coberto com pectina (tratamento 3). Acredita-se que isso pode ter ocorrido devido à influência dos químicos ou devido à restrição de oxigênio que as coberturas podem ter causado.

A formulação a base de pectina (cadáver totalmente e parcialmente coberto), e a base de polietileno glicol dissolveram-se totalmente ao fim do período de observação. Observa-se que apesar da cobertura a base de carragenina sofrer reidratação e amolecimento e a cobertura a base de alginato de sódio sofrer uma reidratação elas não se dissolveram. Ressalta-se que foi detectado a presença de fungos nas coberturas a base de carragenina e alginato de sódio. Os cadáveres dessecados com 72 horas após adição da cobertura possibilitou observar a presença de adultos e hermafroditas no interior. Contudo, a maior parte já se encontrava morta.

O polietileno glicol pode ter influenciado negativamente a sobrevivência de JIs devido à sua capacidade de criar um potencial osmótico, efeito também observado por Andrén e Lagerlöf (1983) para o calcário. As formulações com

calcário aplicadas aos oito dias após a infecção afetaram mais os JIs, talvez em consequência do menor período entre formulação e o início da emergência de JIs. A menor concentração de calcário em torno dos cadáveres formulados na forma aquosa resultou no incremento de JIs emergidos. Aparentemente, o potencial osmótico é amenizado através do tempo e quando diluído. Portanto, em aplicações a campo, deve-se observar as características físico-químicas dos solos, pois as coberturas utilizadas nos cadáveres poderão ser influenciadas por elas (Barbercheck, 1992)

Segundo Kung *et. al.*, (1990) as concentrações mais elevadas dos agentes de imersão geraram um revestimento mais espesso nos cadáveres, que pode ter resultado em níveis de oxigênio reduzido, diminuindo a sobrevivência dos nematoides.

Conforme Shapiro-Ilan *et. al.* (2001), o cadáver revestido com formulações a base de pó demonstrou ser um mecanismo protetor para melhorar armazenamento e aplicação. Com coberturas de argila, glúten, lignina e amido em larvas de *G. mellonella* infectadas com *H. bacteriophora* Hb, encontraram maior tolerância à dessecação e sobrevivência de JIs quando foram formulados aos quatro dias em relação aos formulados aos oito dias. Verificaram que em parte das formulações que aderiram ao cadáver a reprodução do nematoide foi insuficiente ou completamente deficiente.

Del Valle (2009) em seus estudos com cobertura de insetos cadáveres verificou que as diferentes formulações testadas (talco, cápsula de gelatina e calcário calcítico) não apresentaram diferenças significativas quanto ao número de JIs emergidos quando formulados aos quatro dias após a infecção das larvas de *G. mellonella*. No entanto, houve diferenças estatísticas entre os tratamentos quando as coberturas foram aplicadas oito dias após a infecção. Del Valle (2009) constatou que cápsulas de gelatina protegem os cadáveres e não afetam emergência.

Shapiro-Ilan *et. al.* (2010) trabalhando com cadáver de *Tenebrio molitor* infectados por *Heterorhabditis indica* Poinar e *Steinernema carpocapsae* e utilizando uma máquina de embalagem automática, desenvolvida para reduzir o trabalho e padronizar o produto final verificaram que após a exposição a uma agitação mecânica os cadáveres *S. carpocapsae* com fita foram mais resistentes

à ruptura do que cadáveres sem fita. Entretanto, cadáveres de *H. indica* não foram afetados por agitação mecânica (com ou sem fita). *H. indica* quando testados contra os insetos pragas (*Diaprepes abbreviatus* (L.), *Aethina tumida* Murray) verificaram que ambos os tratamentos com fita e sem fita causaram reduções significativas na sobrevivência do inseto em relação ao controle, e não houve diferenças detectadas entre os tratamentos. Concluíram que o método da fita adesiva tem a vantagem de produção em massa facilitada por uma máquina de embalagem automática, mas adicionalmente, oferece uma opção para aplicação manual.

Shapiro-Ilan *et. al.* (2010), desenvolveram uma nova formulação e um sistema de embalagem para os cadáveres infectados. O sistema apresentou potencial para uso no controle de pragas e demonstrou que existe potencial para a utilização de uma formulação para aplicação de cadáveres infectados com nematoides.

Ansari *et. al.* (2009) verificaram que a virulência dos JIs produzidos a partir de cadáveres formulados não era significativamente diferente da virulência dos JIs obtidos a partir de cadáveres não formulados.

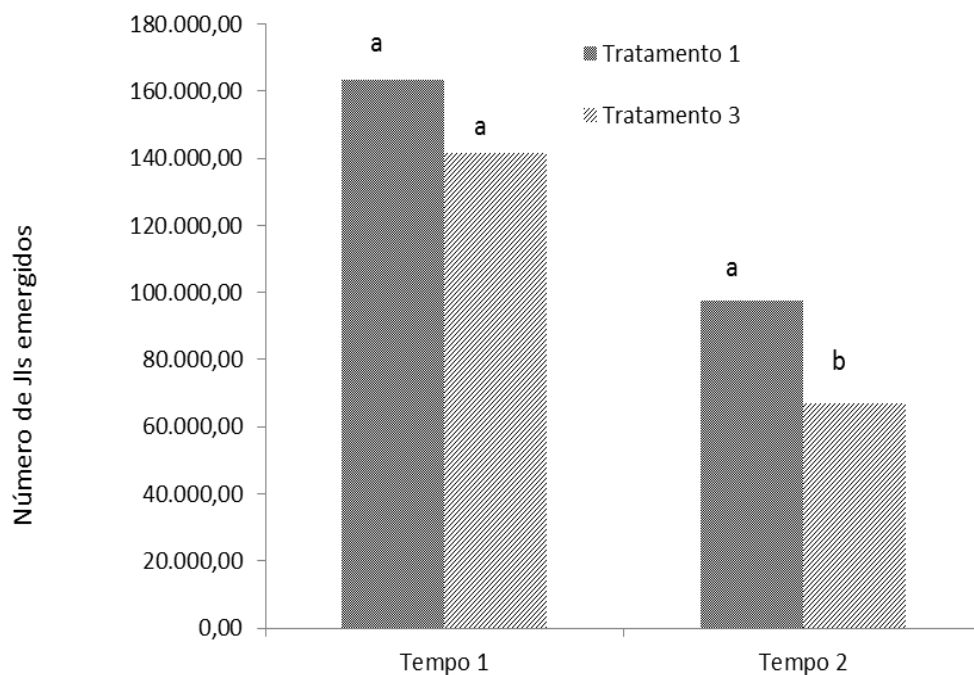


Figura 1: Número médio de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 emergidos de insetos cadáveres formulados com diferentes coberturas (média). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Nas demais coberturas não foi observado juvenis emergidos.

Conforme pode-se observar na Figura 1 os valores médios da produção de JIs do controle (163.326) e do cadáver parcialmente coberto (97.450) no tempo 1 não diferiram entre si. No entanto, no tempo 2 os valores diferem entre si sendo a média no tempo 1 (141.435) superior à média no tempo 2 (66.833).

A massa das *Galleria mellonella* utilizada nos experimentos ficou (0.227186 ± 0.001254) e (0.223342 ± 0.001378) para o primeiro e para o segundo experimento, respectivamente. Observa-se que as massas dos experimentos diferiram estatisticamente entre si. Segundo Dias *et al.* (2008), testaram diferentes massas das larvas de *G. mellonella*, e observaram que as produções de JIs/ml das massas 150, 200 e 300 mg não diferiram entre si (939, 2.009 e 3.455, respectivamente). Na réplica, as produções em larvas com massas de 200 e 300 mg foram maiores e não diferiram entre si, contudo diferiram da massa 150 mg (5.305, 6.407 e 810, respectivamente) ($F = 3,21$; $GL = 3$; $P < 0,05$). Como esperado, a maior produção foi nas larvas de maior massa (300 mg), provavelmente devido ao maior conteúdo celomático e disponibilidade de nutrientes, e portanto menor competição intraespecífica.

Molina *et al.*, (2004) demonstraram que não só o tamanho, mas também as espécies de nematoides entomopatogênicos afetam a produção de JIs. Os presentes resultados vêm dar suporte adicional a essas assertivas e permitem afirmar que, para *H. baujardi* LPP7, doses de 200 a 300 JIs aplicadas sobre larvas de *G. mellonella* com 200 a 300 mg são adequadas para a maior produção de JIs /ml.

Segundo Molina e Lopez (2002), a produção de JIs é diretamente proporcional ao tamanho do hospedeiro. Flanders *et al.*, (1996), trabalhando com *H. bacteriophora* Oswego, obtiveram o dobro da produção de JIs em larvas maiores (300- 400 g), comparada às produções obtidas em larvas menores (100 - 200 g).

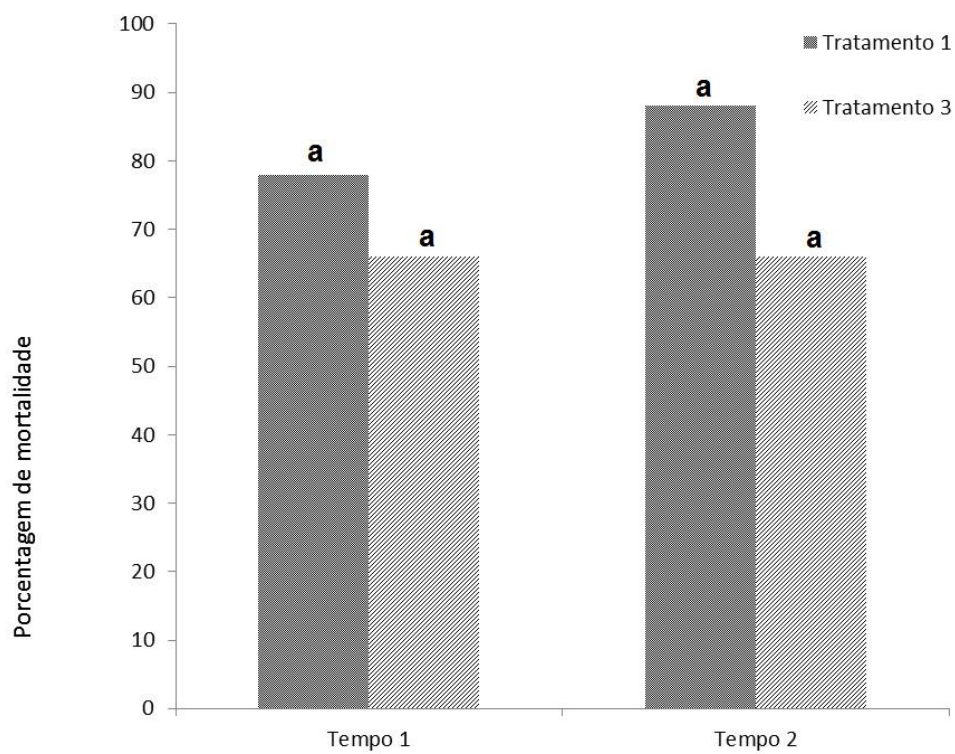


Figura 2: Porcentagem de mortalidade das larvas no sétimo instar de *Galleria mellonella* infectadas com *Heterorhabditis indica* LPP30. Tratamento 1 (controle) e tratamento 3 (cadáver parcialmente coberto com pectina).

Com relação a patogenicidade não verificou-se diferença estatística, como pode ser observado na Figura 2, os valores médios da mortalidade do controle (7.8) e do cadáver parcialmente coberto (8.8) no tempo 1 não diferiram entre si. No entanto, no tempo dois os valores não diferem entre si sendo a média no tempo 1 (6.6) superior à média no tempo 2 (6.6) ao em nível de 5% pelo teste de Tukey.

Uma elevada infectividade às larvas de *G. mellonella* foi observada nos JIs emergidos das diferentes coberturas analisadas. Não foram observadas diferenças significativas nas porcentagens de infecções provocadas pelas coberturas testadas. Estes dados sugerem que os tratamentos de cobertura podem afetar o número de JIs que emergem, mas não há efeito sobre a patogenicidade dos mesmos (Del Valle, 2009).

Conclui-se assim, que os materiais utilizados na produção de JIs do nematoide *Heterorhabditis indica* LPP30 não atenderam satisfatoriamente ao objetivo, visto que não permitiram que ocorresse liberação dos JIs. Observa-se que no caso da pectina provavelmente a restrição de oxigênio pode ter influenciado na liberação dos juvenis, visto que o cadáver coberto parcialmente apresentou liberação enquanto no coberto totalmente não foi observado juvenil emergido. No entanto, para as demais coberturas avaliadas o processo de reprodução pode ter sido afetado pela ausência de oxigênio ou por interferência de alguma substância química.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Georgis, R.; Dunlop, D. B.; Grewall, P.S. (1995). Formulation of entomopathogenic nematodes. *In*: Hall, F. R., Barry, J. W. (Eds). Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197 – 205.
- Kaya, H. K.; Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environment Entomology*. 14: 572 -574.
- Lara, J. C. L.; Bustilho, A. E. (2004). Efecto de entomonemátodos sobre poblaciones de la broca de café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), em frutos em el suelo. *Revista Colombiana de Entomologia*. 30 (2): 179-185.
- Mason, J.; Matthews, G.; Wright, D.; (1999). Evaluation of spinning disc technology for the application of entomopathogenic nematodes against a foliar pest. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 282- 288.
- Navon, A.; Nagalakshmi, V. K.; Leviski, S.; Salame, L.; Glazer, I. (2002). Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopteran pests. *Biocontrol Science Technology*. 12: 737-746.
- Renn, N. (1998). The efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling housefly infestations of intensive pig units. *Medicine Veterinary Entomology*. 12: 46 – 51.
- Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H.; Koppenhofer, A. M. (2002). Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. *In*: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 333- 356.
- White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Nematoides entomopatogênicos, nos últimos anos demonstraram seu potencial como agentes biológicos para o controle de insetos pragas. A utilização em pomares comerciais como insetos cadáveres é uma alternativa que deve ser considerada, especialmente, quando o inseto praga localiza-se no solo ou em ambientes crípticos.

Atualmente um dos desafios para ampliar a utilização dos nematoides entomopatogênicos é conseguir um sistema de produção que seja capaz de gerar NEPs em pequena, média e larga escala onde os processos não sejam de alto custo para que esse fator não constitua um fator limitante para o uso.

Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho testar diferentes coberturas que proporcionem maior proteção e conservação para os cadáveres de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30.

Avaliou-se 4 tipos de formulações base (pectina, carragenina, polietileno glicol e alginato de sódio) a fim de elaborar um filme para cobertura para proporcionar maior proteção aos insetos cadáveres. Avaliou-se a melhor concentração de cada formulação, o melhor local para secagem e o comportamento dos filmes na presença de umidade e o efeito de cada cobertura nos juvenis infectantes. Utilizou-se para isso cadáveres de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis indica* LPP30. Verificou-se que as melhores concentrações para elaboração do filme foi pectina 6%, carragenina 5%, polietileno glicol 200% e alginato de sódio 1.5 % com secagem em bancada.

Observou-se que quando em contato com a areia somente o polietileno glicol dissolveu, no entanto quando os cadáveres ficaram nas armadilhas de White os filmes de pectina também dissolveram. Ressalta-se que apenas no controle e no cadáver parcialmente coberto com pectina ocorreu liberação de Juvenis infectantes. Conclui-se assim, que os materiais utilizados na produção de JIs do nematoide *Heterorhabditis indica* LPP30 não atenderam satisfatoriamente ao objetivo, visto que não permitiram que ocorresse liberação dos JIs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P., Klein, M.G. (2006) Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37:32-49.
- Adams, B.J.; K.B. Nguyen. (2002). Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (ed) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, New York, p. 1-35.
- Akhust, R.J.; K. Smith. (2002). Regulation and safety. In: Gaugler, R. (ed). Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, New York, p. 311-332.
- Allen, L. *et. al.* Edible corn-carbohydrate food coatings, I. Development and physical testing of a starch-algin coating. *Food Technology*, v. 17, p. 1437-1441, 1963.
- Andrén, O.; Lagerlof, J. (1983). Soil fauna (microarthropods, enchytraeids, nematodes) in Swedish agricultural cropping systems. *Acta Agric. Scand.* 33:33-52
- Ansari, M. A. Hussain, M. A. Moens, M. Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthis* in turfgrass *Pest Manag Sci* 2009; 65: 367–374.DOI 10.1002/ps.1699
- Barbercheck, M. E. (1992). Effects of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. *Florida Entomologist*. 75 (4): 539-548.
- Bruck DJ, Shapiro-Ilan DI, Lewis EE. (2005). Evaluation of application technologies of entomopathogenic nematodes for control of the black vine weevil. *J. Econ. Entomol.* 98: 1884–1889.

- Camargo, P.; Moraes, C.; Schemberger, A.; Santos, C.P.; Schemin, M.H.C. (2007). Rendimento da pectina da casca do maracujá em seus estádios diferentes de maturação: verde, maduro e senescência. V Semana de Tecnologia em alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Campus Ponta Grossa, Paraná, Brasil, v. 02, n. 01. ISSN 1981-366X.
- Campbell, L. R., Gaugler, R. (1991) Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 21: 219-224.
- Campbell, L. R., Gaugler, R. (1991b) Role of the sheath in desiccation tolerance of two entomopathogenic nematodes. *Nematologica* 37: 324-332.
- Campbell, J. F., Gaugler, R. (1993) Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* 126: 155-169.
- Campbell, J. F., Gaugler, R. (1997) Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along a continuum? *Fundamental and Applied Nematology* 20: 393-398.
- Capinera, J.L.; N.D. Epsky. (1992). Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. *Florida Entomologist*, 75: 525-532.
- Cardoso, A.C.; Prata, M.C.A.; Furlong, J.; Prezoto, F. (2007) Exigências térmicas de estágios imaturos de *Galleria mellonella* L. (Lepdoptera: Pyralidae). *Neotropical Entomology* 36 (5): 657-661.
- CPKELCO (2012). Disponível em <http://www.cpkelco.com/products-carageenan.html>. Acessado em outubro 2012.
- Chaudhari P, Sharma P, Barhate N, Kulkarni P, Mistry C 2007. Solubility enhancement of hydrophobic drugs using synergistically interacting cyclodextrins and cosolvente. *Curr Sci India* 92:1586-1591.
- Chen J, Spear SK, Huddleston JG, Rogers RD 2005. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chem* 7: 64-82.
- Choudhury, M., Costa, T. S., Araújo, J. L. P. (2001) Goiaba Pós-colheita. Embrapa Informação Tecnológica *Série Frutas do Brasil* 19, Brasília, p. 9.

- Cui, L., Gaugler, R., Wang, Y. (1993) Penetration of Steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 73-78.
- Curran J. (1992). Influence of application method and pest population size on field efficacy of entomopathogenic nematodes. *J. Nemat.* 24: 631–636.
- Del Valle EE, Dolinski C, Souza RM, Samuels RI. (2005a) Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). *Nematol. Bras.* 29: 207-214.
- Del Valle E. E., Dolinski, C., Souza, R.M., Samuels, R.I. (2005b) Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (28) (Nematoda: Rhabditida), Seleccionada para Tolerância a Elevadas Temperaturas, no Controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematologia Brasileira.* 29: 199-205.
- Del Valle EE, Dolinski C, Barreto, ELS, Souza RM, Samuels RI. (2008). Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Bio. Sci. & Tech,* 18 (1): 33-41.
- Dias, P.V.C.; Dolinski, D.; Molina, J.P.A. (2008). Influência as Dose de Juvenis Infectantes e da Massa de Larvas de *Galleria mellonella* (Lepdoptera: Pyralidae) na Produção in Vivo de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae).
- Dolinski C., Del Valle, E.E., Stuart, R.J. (2006). Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control,* 38: 422-427.
- Dolinski, C.; Del Valle, E. E.; Burla, R. S.; Machado, I. R. (2006). Biological traits of two native Brazilian Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida : Heterorhabditidae).
- Dolinski, C. M., Del Valle, E. E., Burla, R. S., Machado, I. R. (2007) Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologia Brasileira,* 31:180-185.
- Dowds, B.C.A., Peters, A. (2002) Virulence Mechanisms. In: GAUGLER, R. (ed.) *Entomopathogenic nematology.* 1.ed. New York: CABI Publishing, p.79-98.

- Duncan, L.W., Graham, J.H., DUNN, D.C., Zellers, J, McCoy C.W., Nguyes, K. (2003) Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology*, 35: 178–186.
- Dunphy, G. B., Webster, J. M. (1986) Temperature effects on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Nematology* 18: 270-272.
- Dutky, S.R., J.V. Thompson; G.E. Cantwe. (1964). A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology*, 6: 417-422.
- Dutky, S. R. (1974). Nematode parasites. *In: Maxwell, F. G., Harris, F. A. (eds.) Proceeding of the summer institute on biological control of plant insects and diseases*. Jackson, University Press of Mississippi, p. 576-590.
- Dutky, S.R., J.V. Thompson & G.E. Cantwell. 1962. A technique for mass rearing the greater wax moth (Lepidoptera: Galleriidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 64: 56-58.
- Eidt, D. C., Thurston, G. S. (1995) Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil pests. *Canadian Entomologist* 127: 423-429.
- Fertonani, H.C.R.; Scabio, A.; Canteri-Schemin, M.H.; Carneiro, E.B.B.; Nogueira, A.; Wosiacki, G. (2006). Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 4, 617-630.
- Fishman, M.L.; Chau, H.K.; Hoagland, P.; Ayyad, K. (2000). Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. *Carbohydrate Research*, 323, 126-138.
- Forst S., Clarke, D. (2002) Bacteria-Nematode Symbiosis *In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology*. p. 57-77.
- Flanders, K.L., J.M. Miller., Shields, E.J. (1996) *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economy Entomology*, 89: 373-380.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C.Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves & J.D. Vendramin. 1988. Manual de

- entomologia agrícola. 2a. edição. Editora Agronômica Ceres Ltda., São Paulo, 649p.
- Gaugler, R. (1981) Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *J. Nematol.* 13(3): 241-249.
- Gaugler, R., Molloy, D. (1981) Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomopathogenic nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *Journal of Nematology* 13: 1-5.
- Gaugler, R. (1988) Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects pests with entomopathogenic nematodes. *Agr. Ecosyst. Environ.* 24(1-3): 351-360.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., Mcguire, T.R. (1989) Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 363 – 372.
- Gaugler, R., HAN, R. (2002) Production technology. In: GAUGLER, R. (ed.). *Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 289-310.
- Georgis, P. S.; Wojetech, W. F.; Shethar, D. J. (1989). Use of *Steinernema feltiae* in a bait for the control of black cutworms (*Agrotis ipsilon*) and tawny mole crickets (*Scapteriscus vicinus*). *Fla Entomology*. 2: 203-204.
- Georgis, R. (1990a). Formulation and application technology. In: Gaugler, R., Kaya H. K. (eds) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. p. 173-194.
- Georgis, R. (1990b). Commercialization of Steinernematid and Heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *Brighton Crop Prot. Conf. Insectic. Fungic.* 1: 275-80.
- Georgis, R., Hague, N. G. M. (1991) Nematodes as biological insecticides. *Pesticide Outlook* 2: 29-32.
- Georgis, R. (1992) Present and future prospects for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 83-99.
- Georgis, R., Poinar, G. O. Jr. (1994) Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. In: Leslie, A.R., EPA U.S., (eds.) *Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals*. p. 477-489.
- Georgis, R.; Dunlop, D. B.; Grewall, P.S. (1995). Formulation of entomopathogenic nematodes. In: Hall, F. R., Barry, J. W. (Eds). *Biorational Pest Control Agents:*

- Formulation and Delivery. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197 – 205.
- Glazer, R.W. (1931). The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science*, 73: 614-615.
- Glazer, I., Gaugler, R., Segal, D. (1991) Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: The diversity of beneficial traits. *J. Nematol.* 23: 324-333.
- Glazer, I. (2002) Survival Biology. *In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology*, p. 169-187.
- Grewal, P. S., Lewis, E. E., Gaugler, R., Campbell, J. F. (1994a) Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitol.* 108: 207-215.
- Grewal, P. S., Selvan, S., Gaugler, R. (1994b) Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. *J. Therm. Biol.* 19: 245-253.
- Grewal, P.S. (1998). Formuation of entomopathogenic nematodes for storage and application. *Japanese Journal of Nematology.* 28: 68-74.
- Grewal, P. S., Georgis, R. (1999) Entomopathogenic nematodes. *In: Hall, F.R., Menn, J.J. (eds.) Bipesticides: Uses and Delivery.* Methods Biotechnol. Totowa, Humana Press Inc. 5: 15- 271.
- Grewal, L.P.S. (2002) Formulation and application technology. *In: GAUGLER, R. (ed.). Entomopathogenic Nematology.* CABI, Wallingford (U.K.) p. 266-284.
- Harris, J.M. (1992). Poly (ethylene glycol). *In: Harris JM (org). Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications.*New York: Plenum Press, p. 1-14.
- Hoffmann, E.J.; A.B. Coombs; Whalon, M.E. (2004). Reproductive Development of Northern and southern strains of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(1):27-32.
- Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A., Briscoe, B. R. (1996) Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology* 6: 317-331.

- Hussaini, S. S., Nagesh, M., Rajeshwari, R., Dar, M. H. (2004) Formulation of host cadavers infected with indigenous *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae: Rhabditida) isolates. *Entomon.* 29 (4):339-344.
- Innocenzi, P.J.; HALL, D.R.; Cross, J.V. (2001). Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Chemical Ecology*, 27 (6): 1.203-1.212.
- Kaya, H. K.; Nelsen, C. E. (1985). Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environment Entomology*. 14: 572 -574.
- Kaya HK. (1990). Soil ecology. In: Gaugler R, Kaya HK, editors. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida. p 93-116.
- Kaya, H. K., Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kaya, H. K., Stock, S. P. (1997) Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, London: Academic Press, p. 281-324.
- King, A. H. Brown seaweed extracts (Alginates). In: FOOD hydrocolloids. Boca Raton: M.Glicksman, 1983. v. 2.
- Kliemann, E. (2006). Extração e Caracterização da Pectina da Casca do Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa). (Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos). Programa de Pós-graduação em ciência dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p.77.
- Korbes, A.P. & Droste, A. (2005). Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.40, n.3, p.211-216
- Lacey, L. A., Goettel, M. S. (1995) Current development in microbial control of insect pest and prospects for the early 21st century, Review. *Entomophaga* 40(1): 3-27.
- Lara, J.C. Avaliação de aspectos biológicos de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) visando aplicação num sistema de irrigação por microaspersão. Tese. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). 74p.

- Lara, J. C. L.; Bustilho, A. E. (2004). Efecto de entomonemátodos sobre poblaciones de la broca de café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), em frutos em el suelo. *Revista Colombiana de Entomología*. 30 (2): 179-185.
- Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, 167-198.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & De Kruif, C. G. (2000). "Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures". *Food Hydrocolloids*, 14, 273–280.
- Lewis, E. E., Gaugler, R., Harrison, R. (1992) Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitol.* 105: 109-115.
- Lewis, E. E., Selvan, S., Campbell, J. F., Gaugler, R. (1995) Changes in foraging behaviour during the infective stage of entomopathogenic nematodes *Parasitology* 110: 583-590.
- Lewis, E.E., Shapiro-Ilan, D.I.. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing (2002). *Journal of Invertebrate Pathology* 81; 25–32
- Lindegren, J.E., K.A. Valero & B.E. Mackey. 1993. Simple "in vivo" production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *J. Nematol.* 25: 193-197.
- Lizarraga, M. S., De Piante Vicin, D., González, R., Rubiolo, A., & Santiago, L. G. (2006). "Rheological behaviour of whey protein concentrate and k-carrageenan aqueous mixtures". *Food Hydrocolloids*, 20(5), 740–748.
- Marcon, M.V.; Vriesmann, L. C.; Wosiacki, G.; Beleski-Carneiro, E. (2005). Pectins from Apple Pomace. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n.2, 127-129p.
- Mason, J.; Matthews, G.; Wright, D.; (1999). Evaluation of spinning disc technology for the application of entomopathogenic nematodes against a foliar pest. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 282- 288.
- Medeiros, J.; Kanis, A. L. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis*

- Sims, Passifloraceae (2010). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(5): 796-802.
- Minas, R.S. (2012). Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visnado o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. (Tese). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ. 138p.
- Misra, S.; Attree, S.M.; Leal, I.; Fowke, L.C. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Annals of Botany*, v.71, p.11-22, 1993.
- Molina, C.H.D., Molina, C.H.C., Molina, E.J.D., Molina, J.P.D., Navas, AP. (2001) Advances in the implementation of high tree-density silvopastoral systems. *In: Ibrahim, M. Internatioal Symposium on Silvopastoral Systems; Congress on Agroforestry and livestock Prpdiction in LAtin America, San José. Anais, San José, Costa Rica, Catie, p. 299-302.*
- Molina, A.J.P. & López, N.J.C. (2002). Produccion *in vivo* de tres entonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Revista Comlombiana Entómologica*, 27: 73-78.
- Navon, A.; Nagalakshmi, V. K.; Leviski, S.; Salame, L.; Glazer, I. (2002). Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopteran pests. *Biocontrol Science Technology*. 12: 737-746.
- Nickle, W. R. (1984) History, development and importance of insect nematology. *In: Nickel, W.R. (Ed.) Plant and insect nematodes.* p. 627-653.
- Peters, A., Ehlers, R. U. (1994) Suceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *T. oleracae*, Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 163-171.
- Peters, A. (1996) The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 389-402.
- Poinar, G. O., Jr. (1979) Nematodes for biological control of insects. 277 p.
- Poinar GO, Hom A. 1986. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoplectana carpocapsae* in the field. *J. Nematol.* 18: 34-36.

- Poinar, G. O., Jr. (1989) Non-insect host for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev Nematol.* 12: 423-28.
- Poinar, G. O., Jr. (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.* p. 23-62.
- Perez EE, Lewis EE, Shaprio-Ilan DI. 2003. Impact of host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) under desiccating conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 111-118.
- Renn, N. (1998). The efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling housefly infestations of intensive pig units. *Medicine Veterinary Entomology.* 12: 46 – 51.
- Rhim, J. W..(2004). "Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films". *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 323–330.
- Rijo, E., N. Matos & A. Barrios. 1996. *Desarrollo de Galleria mellonella* alimentada con dieta a base de derivados de la industria azucarera. *Cienc. Tec. Agric. Protec Plantas* 12 : 61-69.
- Rovesti, L., Heinzpeter, E. W., Tabliente, F., Deseo, K.V. (1988) Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 34: 462-476.
- Rovesti, L., Deseo K. V. (1990) Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 36: 237-245.
- Rovesti, L., Deseo, K. V. (1991) Compatibility of pesticides with entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis heliothidis*. *Nematologica* 37: 113-116.
- Sampaio A. (1977) Gorgulho-da-goiaba tem agora um moderno controle. *Agricultura e Pecuária* 619: 40-41.
- Schroer, S., Ziermann, D., Ehlers, R.U. (2005). Mode of action of a surfactant-polymer formulation to support performance of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Bioscience and Technology*, , 15: 601-613.

- Selvan, S., Gaugler, R., Lewis, E. E. (1993) Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *J. Parasitol.* 79: 167-172.
- Shapiro DI, Glazer I. 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 25: 1455–1461.
- Shapiro DI, Lewis EE. 1999. Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 28: 907-911.
- Shapiro-Ilan, D.I.; Lewis, E.E.; Behle, R.W.; McGuire, M.R.. (2001). Formulation of Entomopathogenic Nematode-Infected Cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology.* **78**, 17–23. doi:10.1006/jipa.2001.5030
- Shapiro-Ilan, D.I.; Gaugler, R.; Tedders, W. L., Brown, I.; Lewis, E. E. (2002). Optimization of Inoculation for In Vivo Production of Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology* 34(4):343–350
- Shapiro-Ilan, D.I., Gouge, D.H., Koppenhofer, A.M. (2002). Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI, New York, NY, pp. 333–356.
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Tedders, W. L. (2003). Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 270-272.
- Shapiro-Ilan DI, Gouge DH, Piggott SJ, Fife JP. (2006). Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control* 38: 124–133.
- Shapiro-Ilan, D.I.; Cottrell, T. E.; Mizell, R. F.; Horton, D. L.; Davis, J. (2009). A novel approach to biological control with entomopathogenic nematodes: Prophylactic control of the peachtree borer, *Synanthedon exitiosa*. *Biological Control* 48: 259–263
- Shapiro-Ilan, D. I., Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Tedders, W. L.. (2010). Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 103–108

- Shields EJ, Testa A, Miller JM, Flanders KL. 1999. Field efficacy and persistence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' and *H. bacteriophora* 'NC' on alfalfa snout beetle larvae (Coleoptera:Curculionidae). *Environ. Entomol.* 28: 128-136.
- SIGMA (2012). Disponível em < <http://www.sigmaaldrich.com>> Acessado em outubro 2012.
- Sudhaus, W. (1993) The nematode genera *Heterorhabditis* and *Steinernema*, both entomopathogenic by means of symbiotic bacteria, are not sister taxa. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 86, p. 146.
- Timper, P., Kaya, H. K. (1989) Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematode preventing infection by Nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 314-321.
- Tomalak, M. (1994) Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) for improved efficacy in control of a mushroom fly, *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera: Sciaridae). *Biocontr. Sci. Technol.* 4: 187-198.
- Toledo, J., Rasgado, M.A., Ibarra, J.E., Gómez, A., Liedo, P., Willians. (2005) T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 627-634.
- Uenojo, M.; Pastore, G.M. (2007). Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, vol. 30, n. 2, 388-394.
- Westerman, P. R. (1992) The influence of time of storage on performance of the insect parasitic nematode *Heterorhabditis* sp. *Fundam. Appl. Nematol.* 15: 407-412.
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66:302-303.
- Zimmerman, R. J., Cranshaw, W. S. (1990) Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenace. *J. Econ. Entomol.* 83: 97-100.
- Zioni (Cohen-Nissan), S., Glazer, I., Segal, D. (1992) Life cycle and reproductive potential of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. *Journal of Nematology* 24: 352-358.

- Zuckerman, B.M., Jansson, H.B. (1984) Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 22: 95 -113s.
- Williams, J.; Cooper, R.M. (2004). The oldest fungicide and newest phytoalexin: a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology* 53:263-279.
- Woodring, L.; H.K. Kaya. (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a Handbook of Techniques*. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville (AR) EUA, 30 p. (Series Bulletin 331)
- Whistler, R. L.; Bemiller, J. N.; Paschall, E. F. *Starch chemistry and technology*. San Diego: Academic Press, 1984.
- White, G. F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.