

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

**Toxicidade letal e subletal do óleo de nim aos ácaros  
*Mononychellus tanajoa* e *Proprioseiopsis neotropicus* (Acari:  
Tetranychidae, Phytoseiidae)**

AMANDA CAROLINA BORGES DA SILVA

São Luís

2012

AMANDA CAROLINA BORGES DA SILVA

Bióloga

**Toxicidade letal e subletal do óleo de nim aos ácaros  
*Mononychellus tanajoa* e *Proprioseiopsis neotropicus* (Acari:  
Tetranychidae, Phytoseiidae)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Adenir Vieira Teodoro

**São Luís**

**2012**

Silva, Amanda Carolina Borges.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Adenir Vieira Teodoro

1.Ácaro-verde. 2.Ácaro predador. 3.Biologia. 4.Concentração letal .  
5.Pesticida alternativo. 6. Seletividade. I.Título

CDU:

AMANDA CAROLINA BORGES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Comissão Julgadora:

---

Dr. Adenir Vieira Teodoro – Embrapa Tabuleiros Costeiros

---

Prof. Dra. Ester Azevedo da Silva – UEMA

---

Prof. Dra. Andréia Serra Galvão - IFMA

**São Luís**

**2012**

*“Tudo que o homem não conhece não existe para ele. Por isso o mundo tem, para cada um, o tamanho que abrange o seu conhecimento”.* (Carlos Bernardo González Pecotche (Raumsol))

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu Deus por tudo que ele tem proporcionado em minha vida, pois sem Ele nada disso teria sido possível, me deu coragem e força nestes dois anos longe da minha família.

A minha querida mãe Vilma Borges da Silva e meu Pai Vandeir Borges (in memoriam), que sempre me apoiaram e proporcionaram valores inestimáveis à minha formação e fizeram de tudo para darem uma boa educação e que sempre me apoiou.

Aos meus irmãos Bruno e Karina que sempre me ajudaram e me apoiaram nesta etapa de minha vida.

Aos meus amigos por sempre me ajudaram e me apoiaram quando estive longe de minha família.

Ao Prof. Dr. Adenir Vieira Teodoro por me iniciar no estudo da Acarologia, pelo estímulo, paciência, amizade, orientação e oportunidades oferecidas. Levarei para sempre o exemplo de profissionalismo, dedicação e compromisso com a pesquisa.

A Prof. Dra. Ester Azevedo da Silva pelas sugestões, estímulo, confiança e por participar da banca de defesa da minha dissertação.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Agroecologia da UEMA pelos ensinamentos.

A Anilde Maciel e Rafael Silva pela amizade, companheirismo e pelo auxílio no experimento em laboratório.

Aos amigos do mestrado que sempre me ajudaram e que tenho grande admiração Aurea, Évila, Tércia, Cristina, Carlos, Flávio, Fagner, Kelly.

As amigas de Campo Grande Luciana, Paula, Débora, que mesmo longe sempre me apoiaram e confiaram na minha capacidade profissional.

A minha professora de Graduação Rosemay Matias por ter me orientado durante a graduação, pelos ensinamentos e contribuído pela minha formação profissional e pelos ensinamentos adquiridos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

Sumário	
Resumo .....	9
Capítulo 1 .....	11
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Toxicidade de pesticidas a artrópodes .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Pesticidas.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Ácaros estudados.....</b>	<b>14</b>
Esboço dos capítulos .....	15
Referências .....	17
<b>Capítulo 2-Toxicidade subletal do óleo de nim na biologia do ácaro verde da mandioca</b> <b><i>Mononychellus tanajoa</i> (Acari: Tetranychidae).....</b>	<b>21</b>
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução .....	25
Material e Métodos .....	26
Resultados.....	28
Discussão.....	29
Tabela 1.....	35
Figura 1.....	37
Capítulo3 .....	38
<b><u>Lethal and Sublethal Toxicity of Neem Oil to the Predatory Mite <i>Proprioseiopsis</i></u></b> <b><u><i>neotropicus</i> (Ehara) (Acari: Phytoseiidae) .....</u></b>	<b><u>39</u></b>
Abstract .....	40
Introduction.....	41
Material and Methods .....	42
Results .....	44
Discussion .....	44
References.....	46
Table 1.....	49
<b>Capítulo4.....</b>	<b><u>52</u></b>

<b>Interferências subletais do óleo de nim na biologia do ácaro predador <i>Proprioseiopsis neotropicus</i> (Acari: Phytoseiidae)</b> .....	52
<b>Resumo</b> .....	54
<b>Abstract</b> .....	55
<b>Introdução</b> .....	56
<b>Material e Métodos</b> .....	57
<b>Resultados</b> .....	59
<b>Discussão</b> .....	60
<b>Agradecimentos</b> .....	62
<b>Referências</b> .....	63
<b>Tabela 1</b> .....	66
<b>ANEXO – Normas das Revistas</b> .....	69
<b>Revista Brasileira de Entomologia</b> .....	70
<b>Neotropical Entomology</b> .....	73



## Resumo

A concentração letal (CL) é frequentemente usada para avaliar a toxicidade de pesticidas a artrópodes, no entanto é considerada uma medida incompleta, pois estima somente a mortalidade como parâmetro de toxicidade. Artrópodes que sobrevivem à aplicação de pesticidas sofrem com efeitos subletais fisiológicos e comportamentais. A taxa de crescimento vem sendo recomendada em conjunto com a concentração letal para avaliar a toxicidade de pesticidas a artrópodes, pois consideram a mortalidade e interferências subletais na fecundidade, respectivamente. Similarmente, estudos de parâmetros biológicos de artrópodes também podem refletir efeitos subletais de pesticidas. Neste estudo, a CL em conjunto com a taxa instantânea e estudos biológicos foram utilizados para avaliar a toxicidade letal e subletal do óleo de nim sobre o ácaro predador *Proprioseiopsis neotropicus* e o ácaro verde da mandioca *Mononychellus tanajoa*. As  $CL_{50}$  do óleo de nim para *P. neotropicus* e *M. tanajoa* foram  $0,00748 \text{ ml/cm}^2$  e  $0,00328 \text{ ml/cm}^2$ , respectivamente, indicando uma maior tolerância do ácaro predador ao pesticida. A taxa instantânea de crescimento de *P. neotropicus* diminuiu com o aumento da concentração de óleo de nim, embora tenha sido observado aumento populacional do ácaro mesmo após a exposição à  $CL_{50}$  do óleo de nim. De maneira geral, a biologia de *P. neotropicus* não foi afetada pela  $CL_{25}$  do óleo de nim. A duração das fases imaturas de *M. tanajoa* foi reduzida quando expostos à  $CL_{50}$  do óleo de nim. Conclui-se que o óleo de nim possui toxicidade letal e subletal aos ácaros *P. neotropicus* e *M. tanajoa*, no entanto por ser mais tóxico ao ácaro verde da mandioca em comparação com o ácaro predador, pode ser uma alternativa no manejo dessa praga.

**Palavras-chave:** Ácaro predador. Ácaro praga. Concentração Letal. Pesticidas naturais. Seletividade.

## Abstract

The lethal concentration (LC) is usually used to evaluate the toxicity of pesticides to arthropods, however it is considered an incomplete measure as it estimates only the mortality as a parameter of toxicity. Arthropods that survive pesticide spraying suffer with physiological and behavioural sublethal effects. Growth rate and lethal concentration studies have been recommended to evaluate the toxicity of pesticides to arthropods because they consider mortality and sublethal alterations on fecundity. Similarly, studies of biological parameters of arthropods may reflect sublethal effects of pesticides. Here, we used the LC and the growth rate in order to evaluate the lethal and sublethal toxicity of the oil of neem to the predatory mite *Proprioseiopsis neotropicus* and the cassava green mite *Mononychellus tanajoa*. The  $LC_{50}$  of the oil of neem to *P. neotropicus* and *M. tanajoa* were 0.00748 ml/cm<sup>2</sup> and 0.00328 ml/cm<sup>2</sup>, respectively, indicating a higher tolerance of the predatory mite to the pesticide. The instantaneous rate of increase of *P. neotropicus* decreased with increasing concentrations of the oil of neem, although population increase was observed even after exposure to the  $LC_{50}$  of the oil of neem. Overall, the biology of *P. neotropicus* was not affected by the  $LC_{25}$  of the neem oil. The duration of immature phases of *M. tanajoa* were faster when exposed to the  $LC_{50}$  of the oil of neem. In conclusion, the oil of neem has lethal and sublethal toxicity to the mites *P. neotropicus* and *M. tanajoa*, however by having a higher toxicity on the cassava green mite in comparison to the predatory mite it may be an alternative to the management of this pest.

**Key words:** Predatory mite. Pest mite. Lethal concentration. Natural pesticides. Selectivity.

## Capítulo 1

---

### INTRODUÇÃO GERAL

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

---

### 1.1. Toxicidade de pesticidas a artrópodes

Para avaliar a toxicidade de pesticidas a artrópodes geralmente são utilizadas medidas letais e subletais (STARK; BANKS 2003, DESNEUX *et al.* 2007). A concentração letal ( $CL_{50}$ ) é o parâmetro predominantemente usado para estimar a toxicidade de pesticidas a artrópodes, e definida como a concentração que mata 50% da população do organismo estudado (DESNEUX *et al.* 2007). A concentração letal é avaliada após a exposição de indivíduos ao pesticida por um curto período de tempo, geralmente de algumas horas a poucos dias (TEODORO *et al.* 2003; STARK; BANKS, 2003).

Artrópodes que sobrevivem a exposição a pesticidas podem apresentar efeitos subletais em sua fisiologia e comportamento (STARK; BANKS, 2003, DESNEUX *et al.* 2007, TEODORO *et al.* 2009). Como exemplos de efeitos subletais, pode-se citar reduções no ciclo de vida, alterações na taxa de crescimento, fertilidade e fecundidade, mudanças na razão sexual, no forrageamento e oviposição (CASTAGNOLI *et al.* 2002, VENZON *et al.* 2005, IRIGARAY *et al.* 2007, TEODORO *et al.* 2009, XUE *et al.* 2009, HAMED I *et al.* 2011). Esses efeitos subletais estão relacionados à toxicidade latente ou crônica, quando os indivíduos são expostos a concentrações letais de pesticidas por alguns dias até durante o período de vida (STARK; BANKS, 2003, DESNEUX *et al.* 2007).

A taxa de crescimento populacional vem sendo recomendada em conjunto com a concentração letal para avaliar a toxicidade de pesticidas a artrópodes, por considerarem além da mortalidade, interferências subletais na fecundidade (STARK *et al.* 1997, WALTHALL; STARK, 1997, TEODORO *et al.* 2009). A taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) é uma medida de crescimento populacional em determinado período de tempo e pode ser utilizada para estimar o aumento das populações de artrópodes (WALTHALL; STARK 1997; STARK; BANKS, 2003). A taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) é positivamente correlacionada com a taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) e possui como vantagem a não necessidade de confecção de tabela de vida (WALTHALL; STARK, 1997).

Estudos de toxicidade letal e subletal de pesticidas a artrópodes podem ser conduzidos em laboratório por meio da utilização da torre de pulverização de Potter (Figura 1) (POTTER 1952).



Figura 1. Torre de Potter utilizada nas pulverizações.

## 1.2. Pesticidas

O uso contínuo de pesticidas sintéticos de amplo espectro, geralmente, acarreta o surgimento de surtos populacionais de pragas, impacto ao meio ambiente, à saúde de pessoas e podem ser tóxicos aos inimigos naturais de ácaros pragas (REIS *et al.* 1998; ALZOUBI; COBANOGLU, 2008; TEODORO *et al.* 2009). Portanto, o uso de pesticidas naturais pode ser uma alternativa para o manejo de pragas.

Pesticidas naturais são eficazes no controle de pragas e, geralmente, possuem baixa toxicidade a inimigos naturais (GAURAHA; SINGH, 2011). Pesticidas derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) controlam eficientemente pragas agrícolas (STARK; RANGUS, 1994). O principal composto ativo do nim é a azadiractina, mas outros compostos como a salanina, nimbidina e nimbina também estão presentes em consideráveis quantidades nas sementes de nim (ISMAN, 2006, ISMAN *et al.* 2011).

O efeito de pesticidas naturais à base de nim tem sido demonstrado em ácaros da família Tetranychidae, afetando sua longevidade, fecundidade, mortalidade e crescimento populacional (GONÇALVES *et al.* 2001a,b, MARTÍNEZ-VILLAR *et al.* 2005). Por exemplo, Venzon *et al.* (2005) avaliaram os efeitos do pesticida à base de nim NimAzal sobre o ácaro fitófago *Oligonychus ilicis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) e seu inimigo natural *Iphiseioides zuluagai* (Denmark e Muma) (Acari: Phytoseiidae) e demonstraram que o pesticida afetou o crescimento populacional e a sobrevivência do ácaro fitófago, no entanto, não houveram efeitos na sobrevivência do ácaro predador. Outro estudo realizado por Mourão

*et al.* (2004), no entanto, demonstrou que o óleo e a torta de nim foram altamente tóxicos ao ácaro predador *I. zuluagai*.

### 1.3. Ácaros estudados

Os ácaros fitófagos da família Tetranychidae são importantes pragas agrícolas (ALZOUBI; COBANOGLU, 2008, MORAES; FLECHTMAN, 2008). As fêmeas de muitos tetraniquídeos tecem grande quantidade de teias, recobrando parcialmente a superfície das folhas que atacam (FLECHTMAN, 1989). Surtos populacionais de tetraniquídeos são favorecidos por tempo quente e seco (DELALIBERA *et al.* 2000, GONÇALVES *et al.* 2001b). Normalmente os ácaros causam sérios danos nas folhas de mandioca no período de seca prolongada (MORAES; FLECHTMAN, 2008). E fatores abióticos como temperatura, umidade e precipitação podem influenciar a infestação de ácaros pragas (TEODORO *et al.* 2009).

O ácaro verde da mandioca *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Figura 2) é encontrado com frequência na parte abaxial das folhas e os principais sintomas de infestação são manchas cloróticas em torno das nervuras, seguido por amarelamento e bronzeamento, e queda de folhas (MORAES; FLECHTMAN, 2008). O baixo retorno econômico e os recursos limitados dos produtores de mandioca inviabilizam o uso de produtos químicos para o controle do ácaro verde da mandioca (BELLOTTI *et al.* 1999). Ácaros da família Phytoseiidae são os principais inimigos naturais de ácaros da família Tetranychidae, e o uso de ácaros predadores para o controle de *M. tanajoa* pode ser uma alternativa para o manejo de ácaros pragas através do controle biológico (REIS *et al.* 2003, ELLIOT *et al.* 2008, LEMOS *et al.* 2011).



Figura 2. Colônia do ácaro verde *Mononychellus tanajoa* em folha de mandioca.

Os ácaros fitoseídeos podem ser encontrados naturalmente no campo. O ácaro predador do gênero *Proprioseiopsis* apresenta registros de ocorrência nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste do Brasil (MORAES *et al.* 2004). De acordo com McMurtry e Croft (1997), os ácaros predadores podem ser agrupados em função de seus diferentes graus de especialização alimentar, de especialista do tipo 1, os quais se alimentam apenas de ácaros fitófagos à generalista do tipo 4, os quais se alimentam tanto de ácaros fitófagos quanto de recursos alternativos como néctar e pólen. O ácaro predador *Proprioseiopsis neotropicus* (Ehara) (Figura 3) pode ser classificado como generalista tipo 4 de acordo com a classificação de McMurtry e Croft (1997).



Figura 3. Ácaro predador *Proprioseiopsis neotropicus*.

### Esboço dos capítulos

No capítulo 2, foi avaliada a toxicidade subletal de óleo de nim na biologia do ácaro verde da mandioca *M. tanajoa*. A  $CL_{50}$  do óleo de nim reduziu a duração das fases imaturas de *M. tanajoa* resultando em menor período de ovo a adulto além de afetar negativamente a fecundidade. O óleo de nim, portanto apresenta toxicidade subletal sobre a biologia do ácaro verde da mandioca *M. tanajoa* e pode ser uma alternativa ecológica no manejo dessa praga.

No capítulo 3, foi utilizada a concentração letal em conjunto com a taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) para avaliar a toxicidade do óleo de nim ao ácaro predador *P. neotropicus*. A taxa instantânea de crescimento do ácaro predador *P. neotropicus* diminuiu com o aumento da concentração do óleo de nim. No entanto, a taxa instantânea de crescimento foi positiva,

indicando crescimento populacional, mesmo após exposição a  $CL_{50}$  do óleo de nim. Apenas concentrações a partir da  $CL_{95}$  causaram a extinção da população de *P. neotropicus*. Concluiu-se que o óleo de nim, em concentrações subletais, afeta negativamente a população do ácaro predador, por meio da mortalidade e fecundidade.

No capítulo 4, o óleo de nim foi utilizado para avaliar efeitos subletais na biologia do ácaro predador *P. neotropicus*. A toxicidade subletal do óleo de nim foi determinada através da comparação de parâmetros biológicos do ácaro predador *P. neotropicus* expostos às  $CL_{25}$  e  $CL_0$  (testemunha). Apenas os ovos do ácaro predador *P. neotropicus* foram afetados pela concentração subletal do óleo de nim. De maneira geral, a concentração correspondente à  $CL_{25}$  do óleo de nim não afetou a biologia de *P. neotropicus*. Portanto, o óleo de nim em concentrações correspondentes à  $CL_{25}$  possui baixa toxicidade ao ácaro predador *P. neotropicus*.



## Referências

ALZOUBI, S.; COBANOGLU S. Toxicity of some pesticides against *Tetranychus urticae* and its predatory mites under laboratory conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 3, p. 30-37, 2008.

BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE S. L. Recent advances in cassava pest management. **Annual Review Entomology**, v. 44, p. 343-370, 1999.

CASTAGNOLI, M; ANGELI, G.; LIGUORI, M.; FORTI, D.; SIMONI, S. Side effects of botanical insecticides on predatory mite *Amblyseius andersoni* (Chant). **Journal of Pest Science**, v. 75, p. 122-127, 2002.

DELALIBERA, I. Jr.; MORAES, G. J.; STEPHEN, L. L.; SILVA, C. A. D.; TAMAI, M. A. Temporal variability and progression of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in populations of *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 523-535, 2000.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007

ELLIOT, S. L.; MORAES, G. J.; MUMFORD, J. D. Failure of the mite-pathogenic fungus *Neozygites tanajoe* and the predatory mite *Neoseiulus idaeus* to control a population of the cassava green mite, *Mononychellus tanajoa*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p. 211-222, 2008.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância agrícola**. São Paulo: Livraria Nobel, 1989. 189p.

GAURAHA, R.; SINGH, R. N. Effect of bio-pesticides on various stages of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 301-303, 2011.

GONÇALVES, M.; OLIVEIRA, J.; BARROS, R.; LIMA, M. Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 475-479, 2001a.

GONÇALVES, M. E. C.; BARROS, R. O.; TORRES, J. B. Efeito de extratos vegetais sobre estágios imaturos e fêmeas adultas de *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 305-309, 2001b.

HAMEDI, N.; FATHIPOUR, Y.; SABER, M. Sublethal effects of abamectin on the biological performance of the predatory mite, *Phytoseius plumifer* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, p. 29-40, 2011.

IRIGARAY SÁENZ-DE-CABEZÓN, F. J.; ZALOM, F. G.; THOMPSON, P. B. Residual toxicity of acaricides to *Galendromus occidentalis* and *Phytoseiulus persimilis* reproductive potential. **Biological Control**, v. 40, p. 153-159, 2007.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews Rev**, v. 10, p. 197-204, 2011.

LEMOS, F.; SARMENTO, R. A.; TEODORO, A. V.; SANTOS, G. R.; NASCIMENTO, I. R. Agroecological strategies for arthropod pest management in Brazil. **Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture**, v. 3, p. 142-154, 2011.

MARTÍNEZ-VILLAR, E.; SÁENZ-DE-CABEZÓN, F. J.; MORENO-GRIJALBA, F.; MARCO, V.; PÉREZ-MORENO, I. Effects of azadirachtin on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**. v.35, p. 215-222, 2005.

MCMURTRY, J. A.; CROFT, B. A. Life style of Phytoseiidae mites and their roles in biological control. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 291-321, 1997.

MORAES, G.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Riberão Preto: Holos, 2008. 308 p.

MORAES, G. J.; McMURTRY J. A.; DENMARK H. A.; CAMPOS, C. B. A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. **Zootaxa**, Auckland, v. 434 1-494, 2004.

MOURÃO, S. A.; SILVA, J. C. T.; GUEDES, R. N. C.; VENZON, M.; JHAM, G. N.; OLIVEIRA, C. L.; ZANUNCIO, J. C. Seletividade de extratos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark Muma (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 613-617, 2004.

POTTER, C. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray films. **Annals of Applied Biology**, v. 39, p. 1–29, 1952.

REIS, P. R.; CHIAVEGATO, G. J. M.; ALVES, E. B.; SOUSA, E. O. Seletividade de agroquímicos ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 265-274, 1998.

REIS, P. R.; SOUSA, O.; TEODORO, A. V.; MARÇAL, P. N. Effect of prey density on the functional and numerical responses of two species of predaceous mites (Acari: Phytoseiidae). **Biological control**, v. 32, p. 461-467, 2003.

STARK, J. D.; BANKS, J. E. Population-level effects of pesticides and other toxicants to arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 505-519, 2003.

STARK, J. D.; RANGUS, T. M. Lethal and sublethal effects of the neem insecticide formulation, margosan-o, on the pea aphid. **Pesticide Science**, v. 41 p. 155-160, 1994.

STARK, J. D.; TANIGOSHI, L.; BOUNFOUR, M.; ANTONELLI, A. Reproductive potencial: Its influence on the susceptibility of a species to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 37, p. 273-279, 1997.

TEODORO, A. V. **Interferências subletais de acaricidas em uma teia alimentar de cafeeiro. 2003.** 67 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa..

TEODORO, A. V.; PALLINI, A.; OLIVEIRA, C. O. Sub-lethal effects of fenbutatin oxide on prey location by the predatory mite *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 47, p. 293-299, 2009.

VENZON, M.; ROSADO, M. C.; FADINI, M. A. M.; CIOCIOLA, A. I.; PALLINI, A. The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests. **Crop Protection**, v. 24, p. 213-219, 2005.

XUE, Y.; MEATS, A.; BEATTIE, G. A. C.; SPOONER-HART, R.; HERRON, G. A. The influence of sublethal deposits of agricultural mineral oil on the functional and numerical responses of *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 48, p. 291-302, 2009.

WALTHALL, W. K.; STARK, J. D. Comparison of two population-level ecotoxicological endpoints: the intrinsic ( $r_m$ ) and instantaneous ( $r_i$ ) rates of increase. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 5, p. 1068-1073, 1997.

## Capítulo 2

---

**Toxicidade subletal do óleo de nim na biologia do ácaro verde da  
mandioca *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)**

**São Luís**

**2012**

## **Toxicidade subletal do óleo de nim na biologia do ácaro verde da mandioca *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)**

Amanda Carolina Borges da Silva<sup>1,4</sup>, Adriano Soares Rêgo<sup>1</sup>, Eugênio Eduardo de Oliveira<sup>2</sup>,  
Rafael Rocha da Silva<sup>1</sup>, Adenir V. Teodoro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão  
(UEMA), Caixa Postal 3004, São Luís, MA, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal, Entomologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV),  
36570-000, Viçosa, MG, Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Caixa Postal 44, Jardins, Aracaju, SE

<sup>4</sup>Autor para correspondência: amandaborges82@hotmail.com

## Resumo

A concentração letal (CL) é comumente usada como parâmetro para avaliação da toxicidade de pesticidas, no entanto, não considera efeitos subletais na população de artrópodes. Artrópodes expostos a concentrações não letais de pesticidas apresentam alterações em diversos parâmetros biológicos. Estudos de determinação da toxicidade subletal de pesticidas botânicos como o óleo de nim na biologia de ácaros fitófagos são necessários para uma avaliação completa de tais pesticidas a essas pragas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade subletal do óleo de nim na biologia do ácaro verde da mandioca *M. tanajoa*. Concentrações subletais do óleo de nim correspondentes à CL<sub>50</sub> reduziram os períodos de duração das fases imaturas de *M. tanajoa*, resultando em menor período de ovo a adulto. A fecundidade, expressa em número de ovos por fêmea e número de ovos por fêmea por dia, foi negativamente afetada em fêmeas de *M. tanajoa* expostas à CL<sub>50</sub> do óleo de nim. Conclui-se que o óleo de nim apresentou toxicidade subletal sobre a biologia de *M. tanajoa* podendo ser um meio alternativo no controle desta praga.

**Palavras chave:** Estudos biológicos, Efeitos subletais, Pesticida botânicos, Toxicidade.

## Abstract

The lethal concentration (LC) is usually used as a parameter to evaluate the toxicity of pesticides, however, it does not take into account sublethal effects on arthropod populations. Arthropods exposed to non lethal concentrations of pesticides exhibit alterations in several biological parameters. Studies of sublethal toxicity of botanical pesticides such as neem oil on the biology of pest mites are necessary to a complete evaluation of such pesticides to these pests. Therefore, we aimed to evaluate the sublethal toxicity of neem oil on the biology of the cassava green mite *M. tanajoa*. Sublethal concentrations of the neem oil corresponding to the LC<sub>50</sub> reduced the periods of the immature stages of *M. tanajoa* resulting in lower period from egg to adult. The number of eggs per day and the number of eggs per female per day, a proxy for fecundity, were negatively affected in *M. tanajoa* females exposed to the LC<sub>50</sub> of neem oil. In conclusion, neem oil showed sublethal toxicity on the biology of the cassava green mite *M. tanajoa* and can be used as an ecological alternative for the management of this pest.

**Key words:** Biological studies, Sublethal effects, Botanicals pesticide, Toxicity.



## Introdução

O ácaro verde *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae) é considerado uma importante praga de cultivos de mandioca *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) nos estados do Nordeste Brasileiro (Delalibera *et al.* 2000; Moraes & Flechtmmann 2008). Temperaturas elevadas e umidade relativa baixa favorecem surtos populacionais desse ácaro, resultando em perdas na cultura da mandioca (Moraes & Flechtmmann 2008). O baixo retorno econômico e os recursos limitados dos produtores de mandioca inviabilizam o uso de produtos químicos no controle do ácaro verde (Bellotti *et al.* 1999)

Pesticidas botânicos à base de nim (*Azadirachia indica*) controlam eficientemente várias espécies de ácaros tetraniquídeos como *M. tanajoa*, *Oligonychus ilicis* (Mc Gregor) e *Tetranychus urticae* (Koch) (Gonçalves *et al.* 2001a; Venzon *et al.* 2005; Gauraha & Singh 2011) e tem como vantagem o baixo custo aos produtores de mandioca. A azadiractina é o principal composto ativo do nim e pode causar inibição alimentar, redução no crescimento, repelência e mortalidade em insetos e ácaros (Stark & Rangus 1994; Martinez & van Emden 2001; Isman 2006; Venzon *et al.* 2005, 2008). Segundo Isman (2006), o nim possui como vantagem a baixa toxicidade aos seres humanos e a rápida degradação no ambiente.

A concentração letal (CL), e especialmente a CL<sub>50</sub>, é comumente usada como parâmetro para avaliação da toxicidade de um pesticida a artrópodes (Desneux *et al.* 2007). A CL<sub>50</sub> é definida como a concentração de determinado pesticida capaz de matar 50% da população do organismo estudado (Stark & Banks 2003). No entanto, a CL<sub>50</sub> não considera efeitos subletais de pesticidas na população de artrópodes. Concentrações não letais de pesticidas apresentam efeitos subletais na fisiologia e comportamento de artrópodes, como por exemplo, redução de fecundidade, interferências no forrageamento, alterações na biologia, anomalias morfológicas, redução da capacidade predatória e na taxa de crescimento (Stark &

Banks 2003; Teodoro *et al.* 2005, 2009; Kim *et al.* 2006; Marcic 2007; Desneux *et al.* 2007). No caso específico de efeitos subletais de pesticidas na biologia de ácaros fitófagos, alterações na longevidade, fertilidade, sobrevivência, duração de fases do desenvolvimento são reportadas (Gonçalves *et al.* 2001b; Marcic 2005; Alzoubi & Cobanoglu 2008). Estudos de determinação da toxicidade subletal de pesticidas botânicos como o óleo de nim na biologia de ácaros fitófagos são necessários para uma avaliação completa do efeito de tais pesticidas a essas pragas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade subletal do óleo de nim sobre a biologia do ácaro verde da mandioca *M. tanajoa*.

## **Material e Métodos**

### Criação estoque do ácaro fitófago

O ácaro verde *M. tanajoa* foi coletado em plantas de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no campus da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão. Plantas de mandioca biofortificadas da variedade Amarela BR 1667 foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade para 5 Kg em casa de vegetação. Após aproximadamente 30 dias, as plantas de mandioca foram infestadas com *M. tanajoa* e mantidas em laboratório (temperatura de  $27 \pm 10^\circ\text{C}$ , umidade relativa e fotoperíodo naturais).

### Determinação da curva de concentração letal

A determinação da curva de concentração letal para *M. tanajoa* foi realizada utilizando fêmeas adultas de mesma idade no início de seu período reprodutivo (8 dias). O óleo de nim Bioneem<sup>®</sup> (Bioneem, Araçuaí – MG) foi pulverizado através de uma Torre de Potter (Potter 1952) (Burkard, Rickmansworth, UK) em discos de folha de mandioca com 3,5 cm de diâmetro. A pulverização foi conduzida a uma pressão de 5 psi/pol<sup>2</sup> em um volume de calda de 2,3 ml, o que corresponde a um depósito de  $1,7 \pm 0,30 \text{ mg/cm}^2$ , o qual está de acordo com

a recomendação da IOBC/WPRS (International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section) (Hassan *et al.* 1994). Discos de folha de mandioca testemunhas foram pulverizados com água destilada.

Após a pulverização, os discos de folha de mandioca foram expostos ao ambiente para secar por um período de uma hora. Posteriormente, um disco foliar foi colocado em uma placa de Petri (10 cm de diâmetro por 1,5 cm de profundidade) sem tampa com água destilada e sobre as quais dez fêmeas de *M. tanajoa* da mesma idade foram transferidas para cada disco foliar, totalizando seis repetições por concentração. As concentrações testadas foram selecionadas por meio de bioensaios iniciais, situando-se entre os limites inferior (0% de mortalidade) e o superior (100% de mortalidade) às fêmeas expostas ao óleo de nim. A mortalidade dos ácaros foi avaliada após 72 horas por meio de um microscópio estereoscópico (Stemi DV4, Zeiss, Alemanha). Os ácaros foram considerados mortos quando não se moviam quando tocados com pincel (Stark *et al.* 1997). As concentrações utilizadas para o óleo de nim foram: 2,5; 7,5; 15; 25; 37,5; 50 ml/l de água destilada. A curva de concentração letal foi estimada através da análise de Probit utilizando o programa software SAS (SAS Institute 2002). A  $CL_{50}$  estimada do óleo de nim foi de 0,00328 ml do óleo de nim/cm<sup>2</sup>,  $X^2 = 4,16$ ,  $P = 0,24$ ; limite inferior: 0,00263, limite superior: 0,00405.

#### Toxicidade subletal do óleo de nim

A toxicidade do óleo de nim na biologia de *M. tanajoa* foi avaliada em condições de laboratório. Para tal, dez fêmeas de *M. tanajoa* foram colocadas em um disco foliar de mandioca por 4 horas para obtenção de ovos da mesma idade. Cada disco foliar de mandioca de (3,5 cm de diâmetro) foi pulverizado em Torre de Potter com a concentração do óleo de nim correspondente à  $CL_{50}$  (0,00328 ml do óleo de nim/cm<sup>2</sup>) conforme descrito acima. Os

discos foliares de mandioca foram expostos para secar por uma hora e posteriormente colocados para flutuar em água destilada em placa de Petri conforme descrito anteriormente.

Os ovos da mesma idade de *M. tanajoa* foram individualizados em um disco foliar de mandioca pulverizado com óleo de nim (CL<sub>50</sub>) ou água destilada (CL<sub>0</sub> - testemunha) e posteriormente observados diariamente às 8:00 horas e 16:00 horas para determinação do período de incubação (temperatura de 27±10°C, umidade relativa e fotoperíodo naturais). Os discos foliares foram substituídas por novos discos pulverizados a cada três dias.

Larvas recém-eclodidas foram individualizadas em discos foliares de mandioca pulverizados e observadas diariamente às 8:00 horas e 16:00 horas para a determinação dos períodos imaturos de larva, protoninfa, deutoninfa e as fases de crisálidas. A fase adulta foi observada apenas às 8:00 horas até sua morte. Os períodos de desenvolvimento de imaturos, períodos de ovo a adulto, períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição do ácaro verde da mandioca *M. tanajoa* expostos às CL<sub>50</sub> e CL<sub>0</sub> foram comparados por meio do Teste t (Sokal & Rohlf, 1995).

## Resultados

O período de incubação dos ovos de *M. tanajoa* expostos à CL<sub>50</sub> do óleo de nim foi menor (1,91 ± 0,19 dias) em comparação com a testemunha (2,18 ± 0,06 dias) (gl = 528, t = -23,35, P < 0,0001) (Figura 1). Similarmente, a duração do período larval de *M. tanajoa* expostos à CL<sub>50</sub> do óleo de nim foi reduzida (0,78 ± 0,25 dias) em relação à testemunha (1,00 ± 0,12 dias) (gl= 188, t = -7,77, P < 0,0001) (Figura 1). As durações dos períodos de protocrisálida (CL<sub>50</sub>: 0,75 ± 0,17 dias; CL<sub>0</sub>: 0,91 ± 0,11 dias; gl= 147, t = -6,86, P < 0,0001), protoninfa (CL<sub>50</sub>: 0,83 ± 0,26 dias; CL<sub>0</sub>: 0,97 ± 0,11 dias; gl= 141, t = -4,17, P < 0,0001), deutocrisálida (CL<sub>50</sub>: 0,72 ± 0,18 dias; CL<sub>0</sub>: 0,86 ± 0,08 dias; gl= 116, t = -5,29, P < 0,0001),

deutoninfa ( $CL_{50}$ :  $0,77 \pm 0,23$  dias;  $CL_0$ :  $0,99 \pm 0,10$  dias;  $gl= 111$ ,  $t = -6,95$ ,  $P < 0,0001$ ) e teliocrisálida ( $CL_{50}$ :  $0,71 \pm 0,14$  dias;  $CL_0$ :  $0,99 \pm 0,09$  dias;  $gl= 95$ ,  $t = -11,31$ ,  $P < 0,0001$ ) também foram reduzidas em ácaros expostos à  $CL_{50}$  em comparação com a  $CL_0$  (testemunha) (Figura 1).

Os períodos de ovo-adulto ( $CL_{50}$ :  $3,04 \pm 0,30$  dias;  $CL_0$ :  $3,20 \pm 0,12$  dias;  $gl= 102$ ,  $t = -3,98$ ,  $P < 0,0001$ ) e de oviposição ( $CL_{50}$ :  $8,75 \pm 5,47$  dias;  $CL_0$ :  $16,31 \pm 1,32$  dias;  $gl= 36$ ,  $t = -6,27$ ,  $P < 0,0001$ ) de *M. tanajoa* expostos à  $CL_{50}$  do óleo de nim foram reduzidos em relação à testemunha ( $CL_0$ ) (Tabela 1). Entretanto, os períodos de pré-oviposição ( $CL_{50}$ :  $1,20 \pm 0,34$  dias;  $CL_0$ :  $1,12 \pm 0,16$  dias;  $gl= 70$ ,  $t = 1,39$ ,  $P= 0,16$ ) e de pós-oviposição ( $CL_{50}$ :  $1,36 \pm 0,42$  dias;  $CL_0$ :  $1,59 \pm 0,21$  dias;  $gl= 24$ ,  $t = -1,65$ ,  $P = 0,11$ ) de *M. tanajoa* não foram afetados pelo óleo de nim (Tabela 1). A fecundidade diária e total de *M. tanajoa*, também foi negativamente afetada pela  $CL_{50}$  do óleo de nim (Tabela 1).

## Discussão

Aspectos biológicos de *M. tanajoa* foram, de maneira geral, alterados por concentrações subletais correspondentes à  $CL_{50}$  de óleo de nim. O ácaro verde da mandioca ocasiona a redução da taxa fotossintética, morte e deformação de brotações e queda de folhas, sobretudo na época seca do ano (Moraes & Flechtmann 2008). Estratégias alternativas de manejo por meio do uso de pesticidas botânicos a base de nim podem ser utilizadas com sucesso no controle de ácaros pragas (Lemos *et al.* 2011). Por exemplo, Martínez-Villar *et al.* (2005) mostraram que a Azadiractina, mesmo em concentrações subletais, afetou a longevidade e fecundidade do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Similarmente, Venzon *et al.* (2008) demonstraram efeitos subletais de nim na sobrevivência e

taxa de crescimento do ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae).

Os períodos imaturos de larva, protoninfa, deutoninfa e as fases de crisálidas de *M. tanajoa* foram reduzidos pela CL<sub>50</sub> de óleo de nim. No estudo realizado por Gonçalves *et al.* (2001) os estágios imaturos de *M. tanajoa* também foram reduzidos pelo extrato de nim. De fato, não foi possível a observação de fases de crisálida em alguns discos foliares pulverizados com óleo de nim mesmo com avaliações duas vezes ao dia. A redução na duração das fases de desenvolvimento de *M. tanajoa* foi, provavelmente, uma estratégia utilizada pelo ácaro para uma menor exposição de suas fases imaturas e sensíveis aos compostos tóxicos do óleo de nim.

A fecundidade de *M. tanajoa* foi afetada pela CL<sub>50</sub> de óleo de nim levando uma redução do número de ovos (diário e total) das fêmeas em relação à testemunha. O período de oviposição foi negativamente afetado com uma redução de 56,64% em relação à testemunha. Gauraha & Singh (2011) mostraram que pesticidas à base de Azadiractina e óleo de nim em diferentes concentrações afetaram a fecundidade de *T. urticae*. No entanto, resultados contrastantes demonstraram que a fecundidade de *M. tanajoa* não foi afetada por concentração letal do extrato aquoso de nim (Gonçalves *et al.* 2001b). Os períodos de pré-oviposição e pós-oviposição de *M. tanajoa* não foram alterados pela CL<sub>50</sub> do óleo de nim,.

Conclui-se que o óleo de nim apresentou toxicidade subletal sobre a biologia de *M. tanajoa*, podendo ser uma alternativa de controle desta praga.

**Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Esta pesquisa foi apoiada pelo projeto: CNPq (474994/2009-0).

## Referências

- Alzoubi, S. & S. Cobanoglu. 2008. Toxicity of some pesticides against *Tetranychus urticae* and its predatory mites under laboratory conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences** 3: 30-37.
- Bellotti, A. C.; L. Smith; S. L. Lapointe. 1999. Recent advances in cassava pest management. **Annual Review Entomology** 44: 343-370.
- Desneux, N.; A. Decourtye; J. M. Delpuech. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52: 81-106.
- Delalibera, I. Jr; G. J. Moraes; S. L. Lapointe; C. A. D. Silva; M. A. Tamai. 2000. Temporal variability and progression of *Neozygites* sp. (Zygomycetes Entomophthorales) in populations of *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29: 523-535.
- Gauraha, R. & R. N. Singh. 2011. Effect of bio-pesticides on various stages of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Research Journal of Agricultural Sciences** 2: 301-303.
- Gonçalves, M. E.C.; R. O. Barros; J. B. Torres. 2001a. Efeito de extratos vegetais sobre estágios imaturos e fêmeas adultas de *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology** 30: 305-309.
- Gonçalves, M.; J. Oliveira; R. Barros; M. Lima. 2001b. Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. **Scientia Agricola** 58: 475-479.
- Hassan, S. A.; F. Bigler; H. Bogenschütz; E. Boller; J. Brun; J. N. M. Calis; J. Coremans-Pelseneer; C. Duso; A. Grove; U. Heimbach; N. Helver; H. Hokkanen; G. B. Lewis; F. Mansur; L. Moreth; L. Polgar; L. Samsoe-Petersen; B. Sauphanor; A. Staubli; G. Sterk; A. Vainio; M. van de Veire; G. Viggiani; H. Vogt. 1994. Results of the sixth Joint Pesticide Testing Programme of the IOBC/WPRS – working group ‘‘Pesticides and Beneficial Organisms’’. **Entomophaga** 39: 107–119.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45-66.



Kim, M.; C. Sim; D. Shin; E. Suh; K. Cho. 2006 Residual and sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on the instantaneous rate of increase of *Tetranychus urticae*. **Crop Protection** **25**: 542-548.

Lemos, F.; R. A. Sarmiento; A. V. Teodoro; G. R. Santos; I. R. Nascimento. 2011 Agroecological strategies for arthropod pest management in Brazil. **Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture** **3**: 142-154.

Marcic, D. 2005. Sublethal effects of tebufenpyrad on the eggs and immatures of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology** **36**: 177-185.

Marcic, D. 2007. Sublethal effects of spiroticlofen on life history and life-table parameters of two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). **Experimental and Applied Acarology** **42**:121-129.

Martinez, S. S. & H. F. van Emden. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology** **30**: 113-125.

Martínez Villar, E.; F. J. Sáenz-de-Cabezón; F. Moreno-Grijalba; V. Marco; I. Pérez-Moreno. 2005. Effects of azadirachtin on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology** **35**: 215-222.

Moraes, G. J. & C. H. W. Flechtmann. 2008. **Manual de acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Holos, Ribeirão Preto, 308 p.

Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray films. **Annals of Applied Biology** **39**: 1-29.

Sato, M. E.; M. Silva; L. R. Gonçalves; M. F. Souza filho; A. Raga. 2002. Toxicidade diferencial de agroquímicos a *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) e *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Neotropical Entomology** **31**: 449-456.

Sokal, R.R. & F. J. Rohlf. 1995. **Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. Freeman, New York, NY, USA.

Stark, J. D. & J. E. Banks. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review of Entomology** **48**: 505-519.

Stark, J. D. & T. M. Rangus. 1994. Lethal and sublethal effects of the neem insecticide formulation, margosan-o, on the pea aphid. **Pesticide Science** **41**: 155-160.

Teodoro A. V.; M. A. M. Fadini; W. P. Lemos; R. N. C. Guedes; A. Pallini. 2005. Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulfur to the predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. **Experimental and Applied Acarology** **36**: 61-70.

Teodoro A. V.; A. Pallini; C. Oliveira. 2009. Sub-lethal effects of fenbutatin oxide on prey location by the predatory mite *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology** **47**: 293-299.

Venzon, M.; M. C. Rosado; M. A. M. Fadini; A. I. Ciociola; A. Pallini. 2005. The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests. **Crop Protection** **24**: 213-219.

Venzon, M.; M. C. Rosado; A. J. Molina-Rugama; V. S. Duarte; R. Dias; A. Pallini. 2008. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). **Crop Protection** **27**: 869-872.

Tabela 1- Duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, número de ovos por fêmea e número de ovos por fêmea por dia do ácaro *M. tanajoa* expostos à CL<sub>0</sub> (controle) e CL<sub>50</sub> do óleo de nim. Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não denotam diferença significativa (Teste t; P > 0,05).

<b>Parâmetros reprodutivos</b>	<b>CL<sub>0</sub></b>		<b>CL<sub>50</sub></b>	
<i>Mononychellus tanajoa</i>	<b>Duração (dias) ± DP<sup>1</sup></b>	<b>n<sup>2</sup></b>	<b>Duração (dias) ± DP</b>	<b>n</b>
Pré-oviposição	1,12 ± 0,16a	56	1,20 ± 0,34a	16
Oviposição	16,31 ± 1,3a	22	8,75 ± 5,47b	16
Pós-oviposição	1,59 ± 0,21a	22	1,36 ± 0,42a	04
Ovos por fêmea	9,13 ± 1,06a	22	3,59 ± 1,60b	16
Ovos por fêmea/ dia	2,26 ± 0,22a	22	1,13 ± 0,26b	16

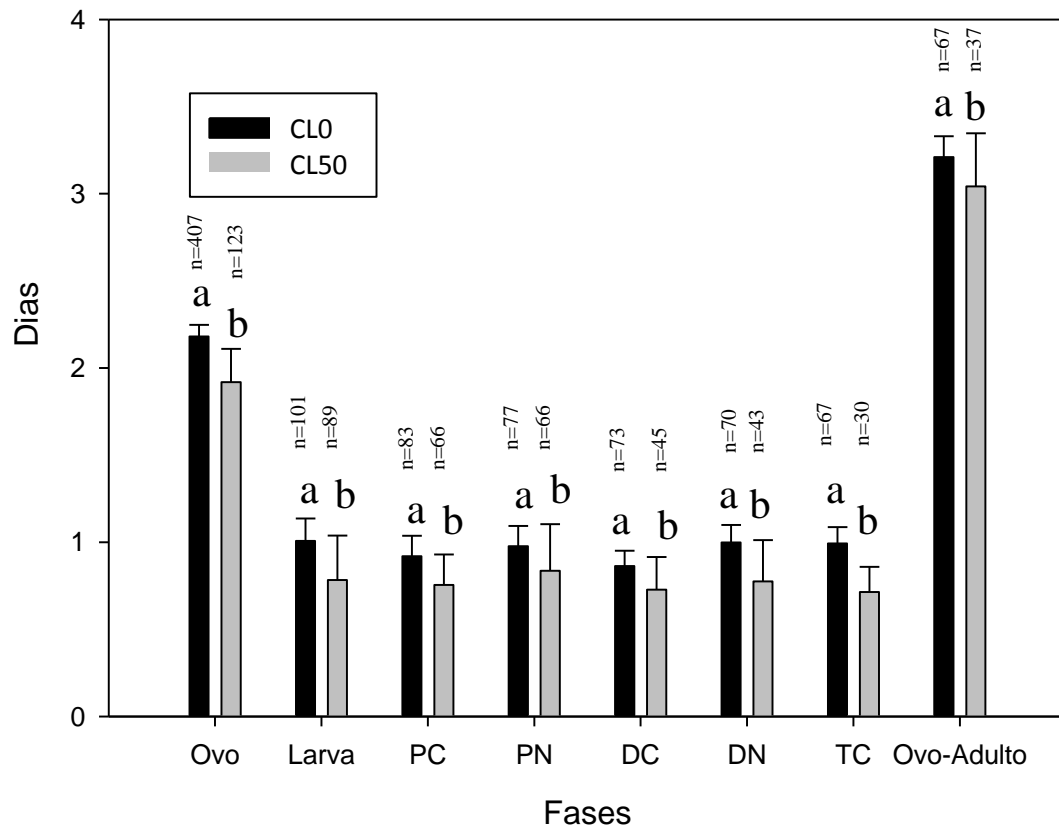
<sup>1</sup>Médias (em dias) ± desvio padrão da média são apresentados.

<sup>2</sup>Número de observações.

**Legenda**

**Figura 1-** Duração dos estádios imaturos e do período de ovo a adulto do ácaro *M. tanajoa* expostos à CL<sub>0</sub> (testemunha) e CL<sub>50</sub> de óleo de nim. Médias + desvio padrão são apresentados. Médias seguidas por diferentes letras entre barras para cada fase do desenvolvimento denotam diferenças significativas (teste t; P < 0,05). PC- Protocrisálida, PN- Protoninfa, DC- Deutocrisálida, DN- Deutoninfa, TC- Teliocrisálida.

Figura 1



## CAPÍTULO 3

---

**Lethal and Sublethal Toxicity of Neem Oil to the Predatory Mite *Proprioseiopsis*  
*neotropicus* (Ehara) (Acari: Phytoseiidae)**

**São Luís**

**2012**

**Lethal and Sublethal Toxicity of Neem Oil to the Predatory Mite *Proprioseiopsis*  
*neotropicus* (Ehara) (Acari: Phytoseiidae)**

ACB SILVA<sup>1</sup>, AV TEODORO<sup>1,2</sup>, EE OLIVEIRA<sup>3</sup>, AGS MACIEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, Caixa Postal 09,  
São Luís, MA

<sup>2</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Caixa Postal 44, Jardins, Aracaju, SE

<sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, 36570-000, Viçosa, MG

Running title: Toxicity of neem oil to *P. neotropicus*

**Abstract** - Neem based pesticides have been used against a variety of pests, but their broadly recognized selectivity to non-target natural enemies has been questioned lately. The lethal concentration (LC), though widely used to estimate the toxicity of pesticides to arthropods, does not consider sublethal effects, which may be measured by quantifying the population growth over a given period of time. Here, we used lethal concentration and the instantaneous rate of increase ( $r_i$ ) to evaluate the lethal and sublethal toxicity of neem oil to the naturally-occurring predatory mite *Propriseiopsis neotropicus* (Ehara). The concentration of neem oil which kills 50% of the population (LC<sub>50</sub>) of the predatory mite *P. neotropicus* was 7.5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . The instantaneous rate of increase of the predatory mite *P. neotropicus* linearly decreased with increasing concentrations of neem oil. In conclusion, the neem oil negatively affects the population of *P. neotropicus* by mortality and sublethal effects on fecundity.

**Keywords:** Biological control, Botanical pesticides, Natural enemy, Selectivity.



## Introduction

The lethal concentration is widely used to assess the toxicity of pesticides to arthropods (Stark & Banks 2003, Desneux *et al* 2007), but it evaluates only mortality as a toxicity parameter. Arthropod populations exposed to pesticides are negatively affected by sublethal effects ranging from reduction in oviposition rates, survival and growth rate to impaired foraging behavior (Stark & Banks 2003, Desneux *et al* 2007, Teodoro *et al* 2005, 2009, Guedes *et al* 2009). Lethal concentration in combination with growth rate studies have been recommended to evaluate the toxicity of pesticides to arthropods as they allow a more complete toxicological assessment of such compounds by integrating both lethal and sublethal effects (Stark *et al* 1997, Teodoro *et al* 2005, Desneux *et al* 2007, Guedes *et al* 2009). The instantaneous rate of increase ( $r_i$ ) is a measure of population growth over a given period of time and it has been successfully used to estimate population increase of arthropods (Walthall & Stark 1997, Stark & Banks 2003). The  $r_i$  is closely correlated with the intrinsic growth rate ( $r_m$ ) with the main advantage that it discards the need of establishment of life table studies (Walthall & Stark 1997). Positive  $r_i$ -values indicate population increase, negative  $r_i$ -values indicate decrease, and  $r_i=0$  indicates a stable population (Walthall & Stark 1997).

Neem (*Azadirachta indica*) based pesticides have been proven to be efficient in controlling a range of agricultural pests and they have been presented as relatively non-toxic to humans and natural enemies (Gonçalves *et al* 2001, Isman 2006, Venzon *et al* 2008, Lemos *et al* 2011). These botanical pesticides contain azadirachtin, a limonoid triterpene and the main insecticidal component able to provoke feeding inhibition, disruption of immature development, lower fecundity and fertility of adults, behavior alterations, cell anomalies and mortality in eggs, larvae and adult stages (Mordue (Luntz) *et al* 2005). However, the alleged selectivity of neem pesticides towards non-target arthropods has been questioned in recent investigations assessing their side-effects (Castagnoli *et al* 2002, Venzon *et al* 2007, Cordeiro *et al* 2010).

Naturally-occurring predatory mites of the family Phytoseiidae are key natural enemies of pest mites (McMurtry & Croft 1997) and they are subjected to the same pesticides exposure in the field as target pest species. However, few studies have addressed the lethal and sublethal effects of botanical pesticides to natural enemies (Venzon *et al* 2007, Cordeiro *et al* 2010). *Proprioseiopsis neotropicus* (Ehara) (Acari: Phytoseiidae) is a generalist predatory mite found on several regions of Brazil inhabiting natural vegetation and crop fields (Moraes *et al* 2004, Mineiro *et al* 2009) that may contribute in the natural regulation of pest mite populations. Here, we aimed at assessing the lethal and sublethal effects of a neem based pesticide to *P. neotropicus* by combining lethal concentration estimates and demographic studies.

## **Material and Methods**

### Mite rearing

Stock cultures of the predatory mite *P. neotropicus* were established from mites collected from *Acacia mangium* plants maintained free from pesticides in São Luís, Maranhão state, Brazil. The rearing methods for *P. neotropicus* were adapted from Reis & Alves (1997). The predatory mite was reared indoors at uncontrolled temperature, humidity and photoperiod. The mites were confined to a plastic arena (5 cm diameter) floating in distilled water within an open Petri dish (10 cm diameter x 1.5 cm depth). Each arena was centrally perforated by a pin attached to the bottom of the Petri dish by a silicon-based glue. Pollen of castor bean *Ricinus communis* was provided as food source every other day (Reis & Alves 1997).

### Concentration-mortality bioassays

Concentration-mortality bioassays were conducted to determine the lethal concentrations of the neem oil Bioneem<sup>®</sup> (Bioneem, Araçuaí – MG, Brazil) to adult females of *P. neotropicus*, at the beginning of their reproductive period (7-8 days old). The neem oil was sprayed through a Potter tower (Potter 1952) (Burkard, Rickmansworth, UK) in plastic arenas (5 cm diameter) at 5 psi/pol<sup>2</sup> pressure with a 2.3 spray aliquot in accordance with recommendations of the International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section (IOBC/WPRS) (Hassan *et al* 1994). Control arenas were sprayed with distilled water.

Sprayed arenas were dried in open air for 1 h before 5 adult females of *P. neotropicus* were placed on them. Five replicates (arenas) for each concentration were used. The arenas were placed to float in Petri dishes in the laboratory as described for rearing the predator colonies. The concentrations were selected after preliminary tests with broad concentration range allowing selection of lower (the highest neem oil concentration unable to kill *P. neotropicus*) and upper (the smallest neem oil concentration able to kill 100% of *P. neotropicus*) mortality responses. The concentrations used ranged from 1.7 to 10.1 µl of the neem oil/ cm<sup>2</sup>. Mite mortality was assessed after 72 h exposure and the mites were considered dead if unable to move for a distance at least equal to their body length (Stark *et al* 1997). Concentration-mortality curves were estimated by Probit analysis using PROC PROBIT procedure (SAS Institute 2002).

#### Growth rate bioassays

The instantaneous rate of increase ( $r_i$ ) was used to evaluate the sublethal effects of the neem oil to the predatory mite *P. neotropicus* based on reproduction and mortality data. This index is calculated using the equation  $r_i = [\ln (N_f/N_0)] / \Delta t$ , where  $N_f$  is the final number of live mites (including eggs and immatures),  $N_0$  is the initial number of mites, and  $\Delta t$  is the interval (7 days) elapsed between start and end of the bioassay (Stark *et al* 1997).

Five adult females of *P. neotropicus* as previously described were placed on arenas sprayed with increasing lethal concentrations (LC<sub>5</sub>, LC<sub>10</sub>, LC<sub>25</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub>, LC<sub>99</sub>) of neem oil, which were based on the concentration-mortality curves previously obtained. Control arenas (LC<sub>0</sub>) were sprayed only with distilled water. Five replicates for each concentration were used. A male predator was added to each arena and replaced whenever it died. Regression analysis was conducted to assess the effects of increasing lethal concentrations of neem oil on the instantaneous rate of increase of *P. neotropicus* using Statistica 7.0 (StatSoft Inc 1984–2004).

## Results

Concentrations of neem oil below the recommended field concentrations (i.e., 15 ml of neem oil/ l of distilled water or 1.7 µl of neem oil/cm<sup>2</sup>) did not kill the predatory mite *P. neotropicus*. However, concentrations immediately above it were able to kill *P. neotropicus*. Table 1 shows the lethal concentrations (LC<sub>5</sub>, LC<sub>10</sub>, LC<sub>25</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub>, LC<sub>99</sub>) of neem oil that were estimated by the concentration-mortality bioassays.

The instantaneous rate of increase ( $r_i$ ) of *P. neotropicus* linearly decreased with increasing lethal concentrations of neem oil (Fig 1). Positive values of  $r_i$  indicate population growth of *P. neotropicus* exposed up to the LC<sub>50</sub>, i.e., 7.5 µl of neem oil/cm<sup>2</sup> ( $r_i = 0.2 \pm 0.03$ /day). Predator extinction took place after exposure to the LC<sub>95</sub> (14.4 µl/cm<sup>2</sup>) of neem oil onwards.

## Discussion

Predatory mites of the family Phytoseiidae are important natural enemies of pest mites and their efficiency is contingent on a combination of a myriad of factors, including pesticide use. Neem based pesticides have been used against a variety of agricultural pests. However, recent studies (Castagnoli *et al* 2002, Venzon *et al* 2007, Cordeiro *et al* 2010) have

questioned the broadly recognized selectivity of these compounds to non-target natural enemies. This might be due to the fact that recent investigations have been focusing on the sublethal effects of pesticides since non-lethal effects may prevail over lethal ones under field conditions.

Lethal concentrations, especially the  $LC_{50}$ , have been widely used to evaluate the toxicity of pesticides to arthropods (Stark & Banks 2003, Desneux *et al* 2007). As observed in previous studies using Neem based pesticides (Cote *et al* 2002), our results for mortality show that the recommended field concentration of Bioneem® ( $1.7 \mu\text{l} / \text{cm}^2$ ) was unable to kill *P. neotropicus*, suggesting that neem oil might have considerable selectivity to this predator. However, this lower mortality might be due to the fact that 72h exposure would be insufficient to evaluate the real mortality caused by neem based pesticides. Azadirachtin, one of the most potent insecticidal molecules present in neem based pesticides, has a field degradation time spanning from one week to three months, i.e. from more than 150h to approximately 2200h (Stark & Walter 1995, Sundaram 1996, Mordue (Luntz) *et al* 2005). Insecticidal actions of insect growth regulators such neem oil based pesticides are well known to take long to occur (Cordeiro *et al* 2010).

Organisms exposed to pesticides are known to suffer with non-lethal effects (Stark & Banks 2003, Desneux *et al* 2007, Teodoro *et al* 2005, 2009, Guedes *et al* 2009) that are, therefore, not visible on mortality bioassays. In this investigation, the fecundity of the predatory mite *P. neotropicus* was directly affected by increases of neem oil concentrations, which might indicate potential impairments of the biological control provided by this natural enemy. Further studies focusing on behavioral responses of *P. neotropicus* on areas treated with neem oil will contribute to a better understanding of the sublethal effects caused by this botanical pesticide.

We conclude that neem oil negatively affects the population of *P. neotropicus* by mortality and sublethal effects on fecundity.

### **Acknowledgements**

We thank Marçal Pedro Neto for the mite species identification, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for funding.

### **References**

- Castagnoli M, Angeli G, Liguori M, Forti D, Simoni S (2002) Side effects of botanical insecticides on predatory mite *Amblyseius andersoni* (Chant). *J Pest Sci* 75: 122-127.
- Cordeiro EMG, Corrêa AS, Venzon M, Guedes RNC (2010) Insecticide survival and behavioral avoidance in the lacewings *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa cubana*. *Chemosphere* 81: 1352-1357.
- Cote KW, Lewis EE, Schultz PB (2002) Compatibility of acaricide residues with *Phytoseiulus persimilis* and their effects on *Tetranychus urticae*. *HortScience* 37: 906-906.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52: 81-106.
- Gonçalves MJ, Oliveira JV, Barros R, Lima M (2001) Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. *Sci Agric* 58: 475-479.
- Guedes RNC, Magalhães LC, Cosme LV (2009) Stimulatory Sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *J Econ Entomol* 102: 170-176.
- Hassan AS, Bigler F, Bogenschütz H, Boller E, Brun J, Calis JNM, Coremans-Pelseneer J, Duso C, Grove A, Heimbach U, Helver N, Hokkanen H, Lewis GB, Mansur F, Moreth L, Polgar L, Samsoe-Petersen L, Sauphanor B, Staubli A, Sterk G, Vainio A, van de Veire M,

- Viggiani G, Vogt H (1994) Results of the sixth Join Pesticide Testing Programme of the IOBC/WPRS – working group “Pesticides and Beneficial Organisms”. *Entomophaga* 39: 107–119.
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51: 45-66.
- Lemos F, Sarmiento RA, Teodoro AV, Santos GR, Nascimento IR (2011) Agroecological strategies for arthropod pest management in Brazil. *Recent Pat Food Nutr Agric* 3: 142-154.
- McMurtry JA, Croft BA (1997) Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Ann Rev Entomol* 42: 291-321.
- Mineiro JLC, Raga A, Sato ME, Lofego AC (2009) Ácaros associados ao cafeeiro (*Coffea* spp.) no estado de São Paulo, Brasil. Parte I. Mesostigmata. *Biota Neotrop* 9: 37-46.
- Moraes GJ, McMurtry JA, Denmark AH, Campos CB (2004) A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa* 434: 1-494.
- Mordue (Luntz) AJ, Morgan ED, Nisbet AJ (2005) Azadirachtin, a natural product in insect control, p. 117-135. In Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds) *Comprehensive molecular insect science*. Oxford, Elsevier, vol. 6.
- Potter C (1952) An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray films. *Ann Appl Biol* 39: 1–29.
- Reis PR, Alves EB (1997) Biologia do ácaro predador *Euseius alatus* DeLeon (Acari: Phytoseiidae). *An Soc Entomol Bras* 26: 359-361.
- SAS Institute (2001) *SAS/STAT User’s Guide*, v.8. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Stark JD, Banks JE (2003) Population-level effects of pesticides and other toxicants to arthropods. *Annu Rev Entomol* 48: 505-519.
- Stark JD, Tanigoshi L, Bounfour M, Antonelli A (1997) Reproductive potential: its influence on the susceptibility of a species to pesticides. *Ecotox Environ Safe* 37: 273–279.

- Stark JD, Walter JF (1995) Persistence of azadirachtin A and azadirachtin B in soil: effects of temperature and microbial activity. *J Environ Sci Health B* 30: 685– 698.
- StatSoft Inc (1984–2004) Statistica for Windows (Software-system for data-analyses), Version 7.0. Tulsa, USA.
- Sundaram KMS (1996) Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behavior and biological effects. *J Environ Sci Health B* 31: 913–948.
- Teodoro AV, Fadini MAM, Lemos WP, Guedes RNC, Pallini A (2005) Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulfur to the predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Oligonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. *Exp Appl Acarol* 36: 61–70.
- Teodoro AV, Pallini A, Oliveira CO (2009) Sub-lethal effects of fenbutatin oxide on prey location by the predatory mite *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae). *Exp Appl Acarol* 47: 293-299.
- Venzon M, Rosado MC, Fialho A, Pereira CJ (2007) Toxicidade letal e subletal do nim sobre o pulgão-verde e seu predador *Eriopsis conexa*. *Pesq Agropec Bras* 42: 627-631.
- Venzon M, Rosado MC, Molina-Rugama AJ, Duarte VS, Dias R, Pallini A (2008) Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). *Crop Prot* 27: 869-872.
- Walthall WK, Stark JD (1997) Comparison of two population-level ecotoxicological endpoints: the intrinsic ( $r_m$ ) and instantaneous ( $r_i$ ) rates of increase. *Environ Toxicol Chem* 5: 1068-1073.



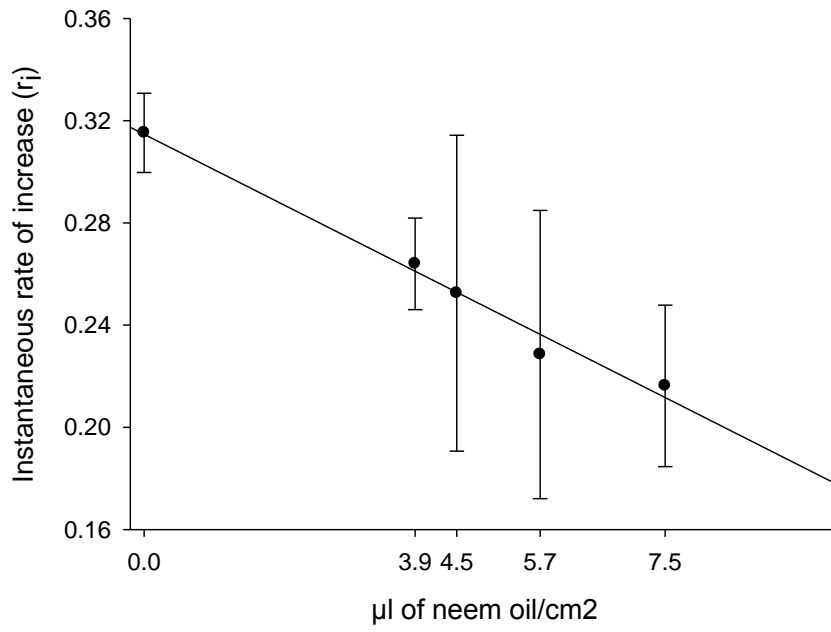
Table 1. Toxicity of the neem oil Bioneem<sup>®</sup> to the predatory mite *Proprioseiopsis neotropicus* ( $n=105$ ,  $\chi^2=0.42$ ,  $P=0.81$ ).

Slope $\pm$ SE	LC <sub>5</sub> (95% CI)	LC <sub>10</sub> (95% CI)	LC <sub>25</sub> (95% CI)	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>95</sub> (95% CI)	LC <sub>99</sub> (95% CI)
5.78 $\pm$ 1.21	3.9 <sup>1</sup> (2.6-4.7)	4.5 (3.3-5.3)	5.7 (4.8-6.5)	7.5 (6.6-8.9)	14.4 (11.2-25.4)	18.9 (13.7-40.1)

<sup>1</sup> $\mu\text{l}$  of neem oil/cm<sup>2</sup>.

**Figure captions**

Fig 1 Instantaneous rate of increase ( $r_i$ ) of the predatory mite *Proprioseiopsis neotropicus* exposed to increasing lethal concentrations of the neem oil Bioneem<sup>®</sup> ( $y = 0.2840 - 0.0015x$ ;  $F_{1,18} = 9.18$ ,  $P = 0.007$ ,  $R^2 = 0.33$ ). Means  $\pm$  SD are shown.

**Fig. 1**

## CAPÍTULO 4

---

**Interferências subletais do óleo de nim na biologia do ácaro predador *Proprioseiopsis neotropicus* (Acari: Phytoseiidae)**

**São Luís**

**2012**

**Interferências subletais do óleo de nim na biologia do ácaro predador *Proprioseiopsis neotropicus* (Acari: Phytoseiidae)**

Amanda Carolina Borges da Silva<sup>1,4</sup>, Anilde da Graça Sousa Maciel<sup>1</sup>, Ester Azevedo da Silva<sup>2</sup>, Adenir Vieira Teodoro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caixa Postal 09, São Luís, MA, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Caixa Postal 09, São Luís, MA

<sup>3</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Caixa Postal 44, Jardins, Aracaju, SE

<sup>4</sup>Autor para correspondência: amandaborges82@hotmail.com

## Resumo

Aspectos biológicos de inimigos naturais são, geralmente, afetados por concentrações subletais de pesticidas influenciando negativamente o controle biológico. No entanto, pouco se sabe sobre efeitos subletais de pesticidas naturais como o óleo de nim na biologia de inimigos naturais. Neste estudo, o óleo de nim foi utilizado para avaliar efeitos subletais sobre a biologia do ácaro predador *Proprioseiopsis neotropicus*. A toxicidade subletal do óleo de nim foi determinada através da comparação de parâmetros biológicos do ácaro predador *P. neotropicus* expostos às  $CL_{25}$  e  $CL_0$  (testemunha). Apenas os ovos do ácaro predador *P. neotropicus* foram afetados pela concentração subletal do óleo de nim. De maneira geral, a concentração correspondente à  $CL_{25}$  do óleo de nim não afetou a biologia de *P. neotropicus*. Conclui-se que o óleo de nim em concentrações correspondentes à  $CL_{25}$  possui baixa toxicidade ao ácaro predador *P. neotropicus*.

Palavras-Chave: Efeito subletal, Phytoseiidae, Concentração subletal, Toxicidade.

## Abstract

Biological aspects of natural enemies are usually affected by sublethal concentrations of pesticides negatively influencing biological control. However, little is known about sublethal effects of natural pesticides such as neem oil on the biology of natural enemies. Here, the sublethal effects of the neem oil on the biology of the predatory mite *Proprioseiopsis neotropicus* were evaluated. Sublethal toxicity of the neem oil was assessed by comparing biological parameters of *P. neotropicus* exposed to LC<sub>25</sub> and LC<sub>0</sub> (control). Only eggs of *P. neotropicus* were affected by the sublethal concentration of neem oil. Overall, the concentration corresponding to the LC<sub>25</sub> of the neem oil did not affect the biology of *P. neotropicus*. We conclude that the neem oil in concentrations corresponding to the LC<sub>25</sub> has a low toxicity to the predatory mite *P. neotropicus*.

Keywords: Sublethal effect, Phytoseiidae, Sublethal concentration, Toxicity.

## Introdução

A concentração letal (CL) é uma medida comumente utilizada para avaliar a toxicidade de pesticidas a artrópodes, no entanto subestima o efeito total desses produtos por considerar apenas a mortalidade como parâmetro (Stark & Banks 2003, Desneux *et al.* 2007). Artrópodes que sobrevivem a exposição à pesticidas exibem efeitos subletais fisiológicos e comportamentais (Stark & Banks 2003, Desneux *et al.* 2007, Teodoro *et al.* 2009). Aspectos biológicos de inimigos naturais são frequentemente afetados por concentrações subletais de pesticidas (Kim & Seo 2001, Irigaray & Zalom 2006, Alzoubi & Cobanoglu 2008, Hamedi *et al.* 2010, 2011), o que leva a interferências no controle biológico de pragas (Lemos *et al.* 2011).

Ácaros predadores da família Phytoseiidae são os principais inimigos naturais de ácaros praga (McMurtry & Croft 1997). Pesticidas naturais à base de nim (*Azadirachia indica*) são eficientes no controle de ácaros fitófagos e possuem como características desejáveis a rápida degradação no meio ambiente, baixa toxicidade aos seres humanos e inimigos naturais (Schmutterer 1997, Gonçalves *et al.* 2001, Lemos *et al.* 2011). No entanto, pouco se sabe sobre as interferências subletais do nim a inimigos naturais como ácaros predadores. Pesticidas à base de nim tem como principal composto ativo o limonóide azadiractina, que atua na inibição alimentar em artrópodes, afeta o desenvolvimento das larvas e atrasa o crescimento, causa interrupção na ecdise, reduz a fertilidade de adultos, mortalidade de ovos, podendo ter efeitos letal e repelente sobre artrópodes pragas (Martinez & van Emden 2001, Mossini & Kimmelmeier 2005, Venzon *et al.* 2005, Sivira *et al.* 2011). O gênero de ácaro predador *Proprioseiopsis* (Ehara) da família Phytoseiidae pode ser encontrado nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste do Brasil contribuindo na regulação natural de ácaros praga (Moraes & Flechtmann 2008, Bellini *et al.* 2010), no entanto não existem



estudos sobre o efeito de pesticidas naturais a ácaros desse gênero. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar dos efeitos subletais do óleo de nim sobre aspectos biológicos de *Proprioseiopsis neotropicus* (Ehara, 1966) (Acari: Phytoseiidae).

## **Material e Métodos**

### Criação de manutenção

O ácaro predador *P. neotropicus* foi coletado em plantas de Acácia (*Acacia mangium*) localizadas no campus da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA. A metodologia de criação de *P. neotropicus* foi adaptada de Reis & Alves (1997), na qual os ácaros foram mantidos em laboratório (temperatura de  $27\pm 10^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa e fotoperíodo naturais). Os ácaros foram confinados em discos de plástico (5 cm de diâmetro), colocadas para flutuar em placa de Petri contendo água destilada (10 cm de diâmetro por 1,5 cm de profundidade) sem tampa. Cada disco foi perfurado ao centro e um alfinete foi fixado ao fundo da placa de Petri com uma cola à base de silicone (Cascola Flexite Henkel<sup>®</sup>). Um plástico rígido transparente em formato côncavo (1 x 0,5 cm) foi colocado em cada disco sobre fibras de algodão natural servindo de local para oviposição e abrigo dos ácaros. Pólen de mamona *Ricinus communis* L. foi oferecido a cada dois dias como fonte de alimento aos ácaros predadores (Reis & Alves 1997).

### Determinação da curva de concentração letal

A curva de concentração letal (CL) foi estimada por meio da exposição de fêmeas adultas de *P. neotropicus* ao óleo de nim Bioneem<sup>®</sup> (Bioneem, Araçuaí – MG) por meio da análise de Probit utilizando o software SAS (SAS Institute 2002). As seguintes concentrações letais foram estimadas: CL<sub>5</sub>, CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub>, CL<sub>99</sub>, no entanto para o estudo da biologia do ácaro predador *P. neotropicus* apenas a CL<sub>25</sub> foi utilizada para avaliar os efeitos subletais

nesta espécie. Para determinação da curva de concentração letal, o óleo nim foi pulverizado através de uma Torre de Potter (Potter 1952) (Burkard, Rickmansworth,UK) em discos de plástico (5 cm de diâmetro) a uma pressão de 5 psi/pol<sup>2</sup> utilizando-se um volume de calda de 2,3 ml. Este volume de calda correspondeu a um depósito de  $1,7 \pm 0,30$  mg/cm, que está de acordo com a recomendação da IOBC/WPRS (International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section) (Hassan *et al.* 2004). Os discos de plástico que serviram de testemunha foram pulverizados com água destilada.

Os discos de plástico pulverizados com o óleo de nim foram expostas ao ambiente por uma hora para secagem e posteriormente colocada em placas de Petri (10 cm de diâmetro por 1,5 cm de profundidade) sem tampa contendo água destilada. Cinco fêmeas de *P. neotropicus* da mesma idade foram transferidas para cada disco, com cinco repetições (discos de plástico) por concentração. As concentrações testadas foram selecionadas por meio de bioensaios iniciais, e se situaram entre concentrações que não causaram mortalidade (limite inferior) e concentrações que causaram 100% de mortalidade (limite superior). As seguintes concentrações foram testadas: 15; 37,5; 50; 62,5; 87,5 ml/l de água destilada. A mortalidade dos ácaros foi avaliada 72 horas após as pulverizações com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Stemi DV4, Zeiss, Alemanha). Os ácaros foram considerados mortos quando não se moviam quando tocados com pincel (Stark *et al.* 1997)

#### Toxicidade subletal do óleo de nim

A toxicidade subletal do óleo de nim foi determinada por meio da comparação de parâmetros biológicos do ácaro predador *P. neotropicus* expostos às CL<sub>25</sub> e CL<sub>0</sub> (testemunha). Para tal, fêmeas e machos adultos de *P. neotropicus* foram colocados em discos de plástico por 12 horas para obtenção de ovos de idade semelhante. Discos de plástico (5 cm de

diâmetro) foram pulverizadas em torre de Potter na concentração de 0,00572 ml do óleo de nim/cm<sup>2</sup>, o que correspondeu à CL<sub>25</sub> de acordo com estudos de determinação da curva de concentração letal (item anterior). Os discos de plástico foram colocados para secar por 24 horas e posteriormente colocados para flutuar em água destilada em placa de Petri conforme acima. Discos de plástico que serviram de testemunha foram pulverizados com água destilada. Os ovos obtidos anteriormente foram individualizados, colocados em lamínulas sobre os discos pulverizados com óleo de nim, haja vista que ovos em contato direto com o pesticida não eclodiram conforme observações preliminares.

A duração do período embrionário foi observada duas vezes ao dia as 8:00 e 16:00 horas nos ovos expostos às CL<sub>25</sub> e CL<sub>0</sub> conforme acima. Larvas recém-eclodidas individualizadas em discos pulverizados foram observadas diariamente às 8:00 e 16:00 horas até atingirem o estágio adulto. Fêmeas e machos recém-emergidos foram avaliados somente uma vez ao dia às 08:00 horas até sua morte. Um macho da criação de manutenção foi adicionado em discos de plástico contendo fêmeas do ácaro predador e os períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição de fêmeas foram determinados. Pólen de mamona foi oferecido a cada dois dias sobre uma lamínula. Fios de algodão natural sobre um plástico rígido transparente de formato côncavo de (1 x 0,5 cm) serviram de abrigo e local de oviposição. Os períodos de desenvolvimento de imaturos, períodos de ovo a adulto, períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição do ácaro predador *P. neotropicus* expostos às CL<sub>25</sub> e CL<sub>0</sub> foram comparados através de teste t (Sokal & Rohlf, 1995)

## **Resultados**

Ovos do ácaro predador *P. neotropicus* transferidos para lamínulas sobre discos de plástico pulverizados com a concentração equivalente à CL<sub>25</sub> do óleo de nim tiveram menores

períodos de incubação ( $1,67 \pm 0,50$  dias) em comparação com a testemunha ( $CL_0$ ) ( $1,94 \pm 0,68$  dias) ( $gl= 145$ ,  $t= 2,44$ ,  $P= 0,01$ ; Figura 1). A duração do período de larvas expostas à  $CL_{25}$  ( $0,43 \pm 0,20$  dias) e à  $CL_0$  ( $0,54 \pm 0,32$  dias) ( $gl= 107$ ,  $t= 1,80$ ,  $P= 0,07$ ) não diferiu estatisticamente. Similarmente, os períodos de protoninfa ( $CL_{25}$ :  $1,04 \pm 0,68$  dias;  $CL_0$ :  $0,97 \pm 0,55$  dias;  $gl= 77$ ,  $t= 0,40$ ,  $P= 0,68$ ) e deutoninfa ( $CL_{25}$ :  $0,92 \pm 0,60$  dias;  $CL_0$ :  $0,98 \pm 0,52$  dias) não foram afetados pela concentração subletal do óleo de nim ( $gl= 66$ ,  $t= 0,42$ ,  $P= 0,67$ ; Figura 1).

A concentração subletal do óleo de nim também não afetou o período de ovo-adulto ( $CL_{25}$ :  $23,50 \pm 12,14$  dias) em relação à testemunha ( $CL_0$ :  $24,88 \pm 11,95$  dias) ( $gl = 34$ ,  $t = 0,31$ ,  $P = 0,75$ ). Os períodos de pré-oviposição ( $CL_{25}$ :  $3,66 \pm 1,36$  dias;  $CL_0$ :  $3,78 \pm 2,32$  dias;  $gl= 18$ ,  $t= 0,11$ ,  $P= 0,90$ ), oviposição ( $CL_{25}$ :  $11,16 \pm 12,95$  dias;  $CL_0$ :  $15,5 \pm 10,33$  dias;  $gl= 18$ ,  $t= 0,79$ ,  $P= 0,43$ ) e de pós-oviposição ( $CL_{25}$ :  $6 \pm 7,81$  dias;  $CL_0$ :  $3,20 \pm 2,77$  dias;  $gl= 6$ ,  $t= 0,75$ ,  $P= 0,47$ ; Tabela 1) não foram afetados pela concentração subletal do óleo de nim. O número de ovos/ fêmea ( $CL_{25}$ :  $5,68 \pm 10,50$  ovos,  $CL_0$ :  $12,66 \pm 16,68$  ovos;  $gl= 20$ ,  $t= 1,14$ ,  $P= 0,26$ ) bem como o número de ovos/ fêmea/dia ( $CL_{25}$ :  $1,36 \pm 0,58$  dias,  $CL_0$ :  $1,21 \pm 0,46$  dias;  $gl= 18$ ,  $t= 0,60$ ,  $P= 0,55$ ) de *P. neotropicus* também não foram afetados pela exposição à  $CL_{25}$  do óleo de nim.

## Discussão

De maneira geral, a concentração correspondente à  $CL_{25}$  do óleo de nim não afetou a biologia do ácaro predador *P. neotropicus*. Apenas o período de incubação foi reduzido em ovos expostos à  $CL_{25}$  do óleo de nim.

Efeitos subletais como a redução na taxa de oviposição, alimentação, sobrevivência, mudanças na razão sexual, alteração do forrageamento podem ser observados em ácaros predadores expostos a pesticidas (Stark & Banks 2003, Desneux *et al.* 2007; Teodoro *et al.*

2005, 2009, Hamedi *et al.* 2011). Neste estudo, a CL<sub>25</sub> de óleo de nim afetou apenas o período de incubação de ovos transferidos para lamínulas sobre discos de plástico pulverizados. Essa metodologia foi adotada porque os ovos expostos diretamente sobre discos pulverizados com o óleo de nim se tornavam inviáveis. Como os ovos não foram expostos diretamente ao pesticida, é possível que o óleo de nim tenha afetado o período de incubação através da liberação de substâncias tóxicas voláteis, no entanto tal hipótese deve ser investigada em estudos posteriores.

Ácaros da família Phytoseidae são os principais inimigos naturais de ácaros praga e sua eficiência depende de diversos fatores externos, como o uso de pesticidas. Pesticidas alternativos como o óleo de nim são eficientes no controle de ácaros fitófagos como os da família Tetranychidae e apresentam baixa toxicidade a inimigos naturais (Schmutterer 1997, Castagnoli *et al.* 2002, Martínez-Villar *et al.* 2005). De fato, concentrações correspondentes à CL<sub>25</sub> do óleo de nim não afetaram a maioria dos parâmetros da biologia do ácaro predador *P. neotropicus* neste estudo. Portanto, é de se esperar que populações do ácaro predador *P. neotropicus* sejam pouco afetadas pelo óleo de nim. Similarmente, Venzon *et al.* (2005) não encontraram efeitos negativos do nim no comportamento e a sobrevivência do ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae) na concentração testada.

O ácaro predador *P. neotropicus* não foi afetado pelo óleo de nim nas fases de larva, protoninfa, deutoninfa, no período de ovo-adulto, e fecundidade com a concentração subletal CL<sub>25</sub> do óleo de nim. Ao contrário do estudo da avaliação da seletividade de extratos de nim sobre o ácaro *Iphiseiodes zuluagai*, que mostrou que a torta de nim foi altamente tóxica a este predador (Mourão *et al.* 2004).

Conclui-se que o óleo de nim em concentrações correspondentes à CL<sub>25</sub> possui baixa toxicidade ao ácaro predador *P. neotropicus*

## **Agradecimentos**

A Marçal Pedro Neto pela identificação do ácaro predador e a Eugênio Eduardo de Oliveira pelas análises de determinação das concentrações letais de óleo de nim. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Esta pesquisa foi apoiada pelo projeto: CNPq (474994/2009-0).

## Referências

- Alzoubi, S. & S. Cobanoglu. 2008. Toxicity of some pesticides against *Tetranychus urticae* and its predatory mites under laboratory conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences** **3**: 30-37.
- Bellini, M. R.; R. V. Araujo; E. S. Silva; G. J. Moraes; E. B. Filho. 2010. Ciclo de vida de *Proprioseiopsis cannaensis* (Muma) (Acari: Phytoseiidae) com diferentes tipos de alimentos. **Neotropical Entomology** **39**: 360-364.
- Castagnoli, M.; G. Angeli; M. Liguori; D. Forti; S. Simoni. 2002. Side effects of botanical insecticides on predatory mite *Amblyseius andersoni* (Chant). **Journal of Pest Science** **75**: 122-127.
- Desneux, N.; A. Decourtye; J. M. Delpuech. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** **52**: 81-106.
- Gonçalves, M.; J. Oliveira; R. Barros; M. Lima. 2001. Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. **Scientia Agricola** **58**: 475-479.
- Hamedi, N.; Y. Fathipour; M. Saber. 2010. Sublethal effects of fenpyroximate on life table parameters of the predatory mite *Phytoseius plumifer*. **BioControl: International Organization for Biological Control (IOBC)** **55**: 271-278.
- Hassan, S. A.; F. Bigler; H. Bogenschütz; E. Boller; J. Brun; J. N. M. Calis; J. Coremans-Pelseneer; C. Duso; A. Grove; U. Heimbach; N. Helver; H. Hokkanen; G. B. Lewis; F. Mansur; L. Moreth; L. Polgar; L. Samsoe-Petersen; B. Sauphanor; A. Staubli A, G. Sterk; A. Vainio; M. van de Veire; G. Viggiani; H. Vogt. 2004. Results of the sixth Join Pesticide Testing Programme of the IOBC/WPRS – working group “Pesticides and Beneficial Organisms”. **Entomophaga** **39**: 107-119.
- Irigaray, F. J. S. C. & F. Zalom. 2006. Side effects of five new acaricides on the predator *Galendromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology** **38**: 299-305.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review Entomology** **51**: 45-66.

- Kim, S. S. & S. G. Seo. 2001. Relative toxicity of some acaricides to the predatory mite, *Amblyseius womersleyi* and the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). **Applied Entomology and Zoology** **36**: 509-514.
- Lemos, F.; R. A. Sarmiento; A. V. Teodoro; G. R. Santos; I. R. Nascimento. 2011. Agroecological strategies for arthropod pest management in Brazil. **Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture** **3**: 142-154.
- Martinez, S. S. & H. F. van Emden. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology** **30**: 113-125.
- Martínez Villar, E.; F. J. Sáenz-de-Cabezón; F. Moreno-Grijalba; V. Marco; I. Pérez-Moreno. 2005. Effects of azadirachtin on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology** **35**: 215-222.
- McMurtry, J. A. & B. A. Croft. 1997. Life style of Phytoseiidae mites and their roles in biological control. **Annual Review of Entomology** **42**: 291-321.
- Moraes, G. & C. H. W. Flechtmann. 2008. **Manual de acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Holos, Ribeirão Preto, 308 p.
- Mossini, S. A. G. & C. Kemmelmeier. 2005. A árvore de nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta farmaceutica bonaerense** **24**: 139: 148.
- Mourão, S. A.; J. C. T.; J. C. T. Silva; R. N. C. Guedes; M. Venzon; G. N. Jham; C. L. Oliveira; J. C. Zanuncio. 2004. Seletividade de extratos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark Muma (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology** **33**: 613-617.
- Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray films. **Annals of Applied Biology** **39**: 1-29.
- Reis, P. R. & E. B. Alves. 1997. Criação do ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **26**: 565-568.
- Sato, M. E.; M. Silva; L. R. Gonçalves; M. F. Souza filho; A. Raga. 2002. Toxicidade diferencial de agroquímicos a *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) e



*Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em morangueiro. **Neotropical Entomology** **31**: 449-456.

Schmutterer, H. 1997. Side-effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. **Journal of Applied Entomology** **121**: 121-128.

Sivira, A.; M. E. Sanabria; N. Valera; Vásquez. 2011. Toxicity of Ethanolic Extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology** **40**:375-379.

Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1995. **Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. Freeman, New York, NY, USA.

Stark, J. D.; J. E. Banks. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants to arthropods. **Annual Review of Entomology** **48**: 505-519.

Teodoro, A. V.; M. A. M. Fadini; W. P. Lemos; R. N. C. Guedes; A. Pallini. 2005. Lethal and sub-lethal selectivity of fenbuntatin oxide and sulfur to the predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. **Experimental and Applied Acarology** **36**: 61-70.

Teodoro, A. V.; A. Pallini; C. Oliveira. 2009. Sub-lethal effects of fenbutatin oxide on prey location by the predatory mite *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology** **47**: 293-299.

Venzon, M.; M. C. Rosado; M. A. M. Fadini; A. I. Ciociola; A. Pallini. 2005. The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests. **Crop Protection** **24**: 213-219

Tabela 1- Duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, número de ovos por fêmea e número de ovos por fêmea por dia do ácaro predador *P. neotropicus* expostos às concentrações CL<sub>0</sub> (controle) e CL<sub>25</sub> do óleo de nim.

<b>Parâmetros reprodutivos</b>	<b>CL<sub>0</sub></b>		<b>CL<sub>25</sub></b>	
<i>Proprioseiopsis neotropicus</i>	<b>Duração (dias) ± DP<sup>1</sup></b>	<b>n<sup>2</sup></b>	<b>Duração (dias) ± DP</b>	<b>n</b>
Pré-Oviposição	3,78 ± 2,32a	14	3,66 ± 1,36a	6
Oviposição	15,5 ± 10,33a	14	11,16 ± 12,95a	6
Pós-Oviposição	3,20 ± 2,77a	5	6,00 ± 7,81a	3
Ovos por Fêmea	12,66 ± 16,68a	14	5,68 ± 10,50a	6
Ovos por Fêmea/ dia	1,21 ± 0,46a	14	1,36 ± 0,58a	6

<sup>1</sup>Médias (em dias) ± desvio padrão da média são apresentados.

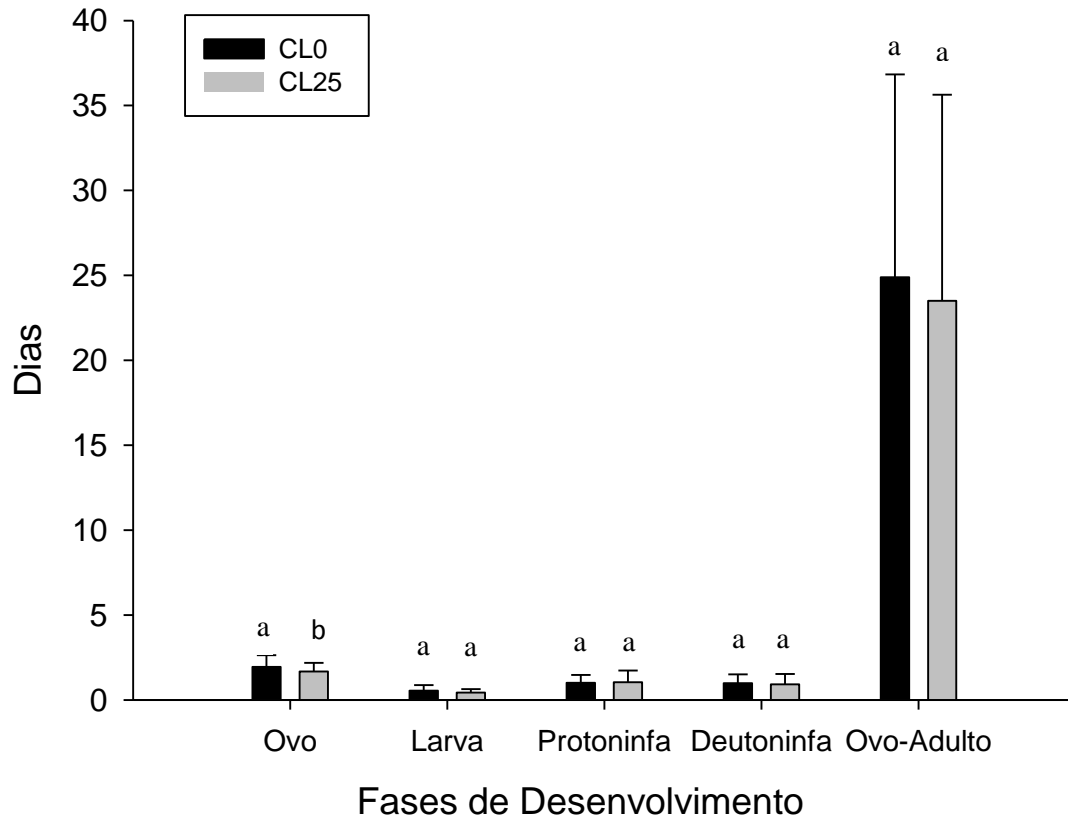
<sup>2</sup>Número de observações.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não denotam diferença significativa entre as concentrações CL<sub>0</sub> e CL<sub>25</sub> (teste t; P > 0,05).

## Legenda

**Figura 1-** Duração dos estádios imaturos e do período de ovo a adulto do ácaro predador *P. neotropicus* expostos às CL<sub>0</sub> (testemunha) e CL<sub>25</sub> de óleo de nim. Médias + desvio padrão são apresentados. Médias seguidas pela mesma letra entre barras para cada fase do desenvolvimento não apresentam diferença significativa (teste t; P > 0,05).

Figura 1.



## **ANEXO – Normas das Revistas**

## **Revista Brasileira de Entomologia**

A Revista Brasileira de Entomologia é um órgão da Sociedade Brasileira de Entomologia (SBE), publica trabalhos científicos inéditos produzidos na área da Entomologia. A RBE mantém seções destinadas à divulgação de comunicações científicas, resenhas bibliográficas e notícias de interesse. A RBE eventualmente poderá publicar sessões contendo pontos de vistas ou revisões a convite da Comissão Editorial.

### **Idiomas**

Os trabalhos deverão ser preferencialmente redigidos em inglês. Manuscritos em outro idioma (português, espanhol) poderão ser aceitos para a publicação a critério da Comissão Editorial.

### **Apresentação**

Os manuscritos deverão ter, no máximo, 120 páginas incluindo as pranchas das figuras. Para manuscritos maiores, os autores deverão consultar a comissão editorial previamente à submissão.

### **Formas de Manuscrito**

O manuscrito deve começar com uma página de rosto, contendo: título do trabalho e nome(s) do(s) autor(es) seguido(s) de número(s) (sobrescrito) com endereço(s) completo(s), inclusive endereço eletrônico, e com respectivos algarismos arábicos para remissão. Não utilizar palavras escritas totalmente em maiúsculas, exceto nas indicações a seguir.

**Abstract.** Com no máximo 250 palavras, com o título do trabalho em inglês e em parágrafo único; **KEYWORDS**, em inglês, em ordem alfabética e no máximo cinco. Na sequência virá o **RESUMO** em português, incluindo o título e **PALAVRAS-CHAVE**, em ordem alfabética e equivalentes às **KEYWORDS**. Devem ser evitadas palavras-chave que constem do título e do resumo do artigo.

No corpo do texto, os nomes do grupo-gênero e do grupo-espécie devem ser escritos em itálico. Os nomes científicos devem ser seguidos de autor e data, pelo menos na primeira vez. Não usar sinais de marcação, de ênfase, ou quaisquer outros. Conforme o caso (manuscritos de outra área, que não sejam de Sistemática, Morfologia e Biogeografia), a Comissão Editorial decidirá como proceder.

As referências devem ser citadas da seguinte forma: Canhedo (2004); (Canhedo 2003, 2004); (Canhedo 2004; Martins & Galileo 2004); Parra *et al.* (2004).

**Figuras** (fotografias, desenhos, gráficos e mapas) devem ser sempre numeradas com algarismos arábicos e, na medida do possível, na ordem de chamada no texto. As escalas devem ser colocadas na posição vertical ou horizontal.

**Tabelas.** Devem ser numeradas com algarismos romanos e incluídas, no final do texto em páginas separadas. Se necessários gráficos podem ser incluídos no arquivo do texto e, como as tabelas, deverão vir no final do texto.

As figuras devem ser enviadas em arquivos suplementares, com, no mínimo, 300 dpi de resolução para fotos coloridas e 600 dpi para desenhos a traço e fotos branco e preto, em formato tiff ou jpeg de baixa compactação, sendo que os manuscritos que não atendam às configurações indicadas acima serão devolvidos. O tamanho da prancha deve ser proporcional ao espelho da página (23 x 17,5 cm), de preferência não superior a duas vezes. Para a numeração das figuras utilizar Times New Roman 11, com o número colocado à direita e abaixo. Isto só deve ser aplicado para as pranchas quando em seu tamanho final de publicação. A fonte Times New Roman deve ser usada também para rotulagem inserida em fotos, desenhos e mapas (letras ou números utilizados para indicar nomes das estruturas, abreviaturas etc.) e em tamanho apropriado de modo que em seu tamanho final não fique mais destacada que as figuras propriamente ditas. Fotografias (preto e branco ou coloridas) e desenhos a traço devem ser montados em pranchas distintas. A Comissão Editorial poderá fazer alterações ou solicitar aos autores uma nova montagem, bem como o envio de novos arquivos de figuras. As legendas das figuras devem ser apresentadas no arquivo de texto. O custo da publicação de pranchas coloridas deverá ser arcado pelos autores.

**Agradecimentos.** Devem ser relacionados no final do trabalho, imediatamente antes das Referências. Sugere-se aos autores que sejam sucintos e objetivos.

**Referências.** Adota-se o seguinte:

1. **Periódicos** (os títulos dos periódicos devem ser escritos por extenso e em negrito, assim como o volume do periódico):

Zanol, K. M. R. 1999. Revisão do gênero *Bahita* Oman, 1936 (Homoptera, Cicadellidae, Deltocephalinae). **Biociências** 7: 73-145.

Martins, U. R. & M. H. M. Galileo. 2004. Contribuição ao conhecimento dos Hemilophini (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), principalmente da Costa Rica. **Revista Brasileira de Entomologia** **48**: 467-472.

Alves-dos-Santos, I. 2004. Biologia da nidificação de *Anthodioctes megachiloides* Holmberg (Anthidiini, Megachilidae, Apoidea). **Revista Brasileira de Zoologia** **21**: 739-744.

## **2. Livros:**

Michener, C. D. 2000. **The Bees of the World**. Baltimore, Johns Hopkins University Press, xiv+913 p.

## **3. Capítulo de livro:**

Ball, G. E. 1985. Reconstructed phylogeny and geographical history of genera of the tribe Galeritini (Coleoptera: Carabidae), p. 276-321. *In*: G. E. Ball (ed.). **Taxonomy, Phylogeny and Zoogeography of Beetles and Ants**. Dordrecht, W. Junk Publishers, xiii+514 p.

## **4. Internet:**

Geller-Grimm, F. 2008. Database Asilidae: Catalog of species. Disponível em: <http://www.geller-grimm.de/catalog/species.htm> (acessado em 19 de novembro de 2008).

Referências a resumos de eventos não são permitidas e deve-se evitar a citação de dissertações e teses.

Nas Comunicações Científicas o texto deve ser corrido sem divisão em itens (Material e Métodos, Resultados e Discussão). Inclua o Abstract e o Resumo seguidos das Keywords e Palavras-Chave.



## Neotropical Entomology

Publishes original articles that significantly contribute to the knowledge of Entomology. Articles previously published or submitted to other journals are not accepted. Articles must be scientific. Technological-content papers with bioassays on efficacy of methods to control insects and mites are not accepted. Manuscripts are peer-reviewed and acceptance for publication is based on recommendations by the editorial board and peer-reviewers.

### Sections

"Forum", "Ecology, Behavior and Bionomics", "Systematics, Morphology and Physiology", "Biological Control", "Pest Management", "Public Health", "Scientific Notes".

### Languages

Manuscript should be written in English.

### Format

Manuscripts can be published as scientific articles, scientific notes and forum articles.

## Form and preparation of manuscripts

Articles (text and tables) must be submitted as MS Word 2003 or other recent word processor. Set paper size in A4 and 2.5 cm margins; number all lines and pages in the document. Use font Times New Roman 12 and double spaces.

**Front page.** Justify the complete name and the regular and electronic mail addresses of corresponding author on the upper right of the page. Center-justify the title using capital initials (except for prepositions and articles). Scientific names in the title should be followed by the author's name (do not mention the year) and, by the order and family names in parentheses. Author names should be left-justified below the title using small capital letters; only initials of the first and middle names of authors are provided followed by the last names in full. Names of different authors are separated by commas; do not use "and" or "&". Skip one line and list each authors' affiliation identified by call numbers whenever more than one address is listed. Skip another line and provide a running title, no longer than 60 letters.

**Page 2. Abstract.** The abstract should be easy to understand and not require reference to the body of the article. Only very important results should be presented in the abstract; it must not contain any abbreviations or statistical details. Type ABSTRACT followed by a hyphen and the text. The abstract should be one-paragraph long and not exceed 250 words. Skip one line and

type Keywords. Type three to five keywords separated by commas; these words cannot be in the title.

### **Main Text**

**Introduction.** Left-justify the subtitle "Introduction" in bold. The introduction must clearly contextualize the research problem and state the scientific hypothesis being tested, as well as the research objectives.

**Material and Methods** must provide enough information for the research to be replicated. Please include the statistical design and, if necessary, the name of the program used for analysis.

**Results and Discussion** can be grouped or kept in separate sections. In Results, mean values must be followed by the mean standard error and the number of observations. Use one decimal for mean values and two decimals for standard errors. Conclusions must be stated at the end of discussion.

**Acknowledgments** should be concise and contain the recognition to people first, and then to affiliations and/or sponsors.

### **References**

Under the title, type the references, in alphabetical order, one per paragraph, with no space between them. The authors last names are typed in full, followed by capital initials. Use a comma to separate the names of authors. Add the reference year after the authors' names, between parentheses. Abbreviate the titles of the bibliographical sources, starting with capital letters. Use journal abbreviations according to the BIOSIS Serial Sources ([www.library.uiuc.edu/biotech/j-abbrev.html#abbrev](http://www.library.uiuc.edu/biotech/j-abbrev.html#abbrev) or <http://www.library.uq.edu.au/faqs/endnote/biosciences.txt>). Abbreviation of Brazilian journal titles must follow each journal requirements. Please avoid citations of dissertations, theses, and extension materials. Do not cite restricted-circulation materials (such as institutional documentation and research reports), monographs, partial research reports, or abstracts of papers presented at scientific meetings.

### **Examples:**

Suzuki KM, Almeida SA, Sodr e LMK, Pascual ANT, Sofia S H (2006) Genetic similarity among male bees of *Euglossa truncata* Rebelo & Moure (Hymenoptera: Apidae). Neotrop Entomol 35: 477-482.

Malavasi A, Zucchi RA (2000) Moscas-das-frutas de import ncia econ mica no Brasil: conhecimento b sico e aplicado. Ribeir o Preto, Holos Editora, 327p.

Oliveira Filho AT, Ratter JT (2002) Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome, p.91-120. In Oliveira PS, Marquis RJ (eds) The

cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna. New York, Columbia University Press, 398p.

### Tables

Tables should be placed separately, one per page, after the References section. Please number tables consecutively with Arabic numbers at the same order they are referred in the text. Footnotes must have call numbers. Use the word "Table" in full in the text (example: Table 1). Example of a table title:

Table 1 Mean ( $\pm$  SE) duration and survivorship of larvae and pupae of *Cirrospilus neotropicus* reared on *Phyllocnistis citrella* larvae. Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH: 70% and photophase: 14h.

### Figures

Insert the list of figures after the tables. Use the abbreviation "Fig" in the titles and in the text (such as Fig 3). Figures must be in jpg, gif or eps format. Use original or high resolution figures. Whenever possible, graphics should be sent in Excell. Example of a figure title:

Fig 1 Populacional distribution of *Mahanarva fimbriolata* in São Carlos, SP, 2002 to 2005.

### In-text citations

#### Scientific names

Write the scientific names in full, followed by the author's name (for insect and mite species), when they are first mentioned in the Abstract and in the body of the text. E.g.: *Spodoptera frugiperda* (J E Smith). Use the abbreviated generic name (E.g.: *S. frugiperda*) in the rest of the paper, except in tables and figures, where name should be in full.

### References

Write the author's last name with capital initial, followed by the year of publication (for example, Martins 1998). More than one publication are chronologically ordered, separated with comas (for example: Martins 1998, Garcia 2005, 2008, Wilson 2010). Use "&" for two authors (such as Martins & Gomes 2009). Please use italicized "*et al*" for more than two authors (as in Duarte *et al* 2010).

### Scientific Notes

Manuscripts that report trophic occurrences, interactions or new methods for the study of insects and mites can be submitted. But records of species or host associations to new localities in geographical regions that they are already known are no longer accepted for publication. Records of species or associations known to a geographical region may be considered only if

including new ecological zones. Distribution records must not be based on political borders, but on ecosystems. Manuscript requirements are the same as for scientific articles. However, Introduction, Material and Methods, and Results and Discussion are written without subtitles. The abstract must be shorter than 100 words and the text no longer than 1,000 words. Figures or tables can be included if highly necessary, but not exceed the limit of two figures or tables per note.

Scientific notes that register a new pest introduced in Brazil need to follow the regulations of Portaria Interministerial 290, of 15/April/1996, available in **Reviews (Forum)**

Extensive interpretative or evaluative articles on current topics in Entomology are published in this section. Controversial articles are welcome and must present both the currently accepted and the controversial paradigms or views. Neotropical Entomology and its Editorial Board are not responsible for the opinions expressed in this section. Articles to be included herein must be in English.

### **Printing Fees**

The printing fee is US\$ 24 (twenty four dollars) per printed page for SEB members (first authors) with a paid membership fee, and US\$ 36 (thirty six dollars) for non-members. Color figures should be added only if highly necessary. Each colour page will cost US\$ 75 (seventy five dollars) for members and US\$ 90 (ninety dollars) for non-members. Reprints will not be provided. Published articles are available for free consultation and download at the site of SciELO ([www.scielo.br/ne](http://www.scielo.br/ne)).