

Letalidade de cinco entomopatógenos à lagarta de *Urbanus velinus* (PLÖTZ, 1880) em condições de laboratório

*Lethality of five entomopathogens in caterpillar *Urbanus velinus* (PLÖTZ, 1880) in laboratory conditions*

Michela Rocha Leal¹, Alzimiro Marcelo Contreiro Castilho², Elen de Lima Aguiar-Menezes³,
Henrique Trevisan⁴, Acacio Geraldo de Carvalho⁵, Thiago Sampaio de Souza⁶

RESUMO: As larvas de *Urbanus velinus* (Plötz, 1880) (Lepidoptera: Hesperidae) promovem desfolhamento em árvores de *Clitoria fairchildiana* Howard (Fabaceae, Papilionidae), espécie florestal muito empregada em arborização urbana e sombreamento de rodovias em diferentes regiões do Brasil. Objetivou-se no presente trabalho avaliar a letalidade de quatro entomopatógenos sobre *U. velinus* em condições de laboratório. O bioensaio foi conduzido com quatro repetições (10 lagartas de 4º instar/tratamento), em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos: três espécies de fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, e *Cladosporium* sp. da Agribio®), dois produtos biológicos a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bacillusbio® da Agribio® e Dipel®) e a testemunha, que correspondeu somente a solução aquosa de Tween 80® a 0,05%. Após 24h da aplicação dos tratamentos, observações diárias das lagartas foram realizadas a cada 24h durante sete dias para verificar a mortalidade. Ao final do bioensaio, todos os agentes entomopatogênicos avaliados foram igualmente patogênicos às lagartas de *U. velinus*, diferindo da testemunha.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. *Beauveria bassiana*. Controle biológico. Lagarta do sombreiro. *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT: Larvae of *Urbanus velinus* (Plötz, 1880) (Lepidoptera: Hesperidae) cause removal of leaves on *Clitoria fairchildiana* Howard (Fabaceae, Papilionidae), a forest species highly frequent in urban tree planting and in road linings in different regions of Brazil. The lethality of four entomopathogens on *U. velinus* in the laboratory was evaluated. Randomized bioassay was conducted with four replications (10 caterpillars at 4th instar/treatment) and six treatments: three species of entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Cladosporium* sp. of Agribio®), two biological products with entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bacillusbio® of Agribio® and Dipel®) and blank, or rather, an aqueous solution of Tween 80® at 0.05%. After application of treatments for 24 h, caterpillars were observed daily every 24h, during seven days for mortality. By the end of the bioassay, one could verify that evaluated entomopathogenic agents were pathogenically similar to all *U. velinus* caterpillar, with the exception of blank.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. *Beauveria bassiana*. Biological control. Caterpillar. *Metarhizium anisopliae*.

Autor correspondente:

Thiago Sampaio de Souza: thiagosampaio.agro@gmail.com

Recebido em: 26/06/2020

Aceito em: 23/12/2020

¹ Doutora em Ciências Ambientais e Florestais, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais (PPGCAF), Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica (RJ), Brasil.

² Agribio Defensivos Alternativos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica (RJ), Brasil.

³ Doutora em Entomologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica (RJ), Brasil.

⁴ Pós-Doutor em Ciências Ambientais e Florestais, Departamento de Produtos Florestais, Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica (RJ), Brasil.

⁵ Doutor em Ciências Ambientais e Florestais, Departamento de Produtos Florestais, Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica (RJ), Brasil.

⁶ Mestre em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF), Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica (RJ), Brasil.

INTRODUÇÃO

Urbanus velinus (Plötz, 1880) (Lepidoptera: HesperIIDae) possui a espécie florestal *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard (Fabaceae) como hospedeira típica. Essa planta, embora originária da região Norte do Brasil, foi introduzida no Sudeste do Brasil onde é muito utilizada na arborização urbana (LORENZI, 2008). Em picos anuais, *C. fairchildiana* pode apresentar sua copa completamente desfolhada pela ação das lagartas de *U. velinus*.

Por se tratar de um manejo da praga principalmente em área urbana, existe uma série de regramentos legais à utilização de compostos químicos (LIMA NETO *et al.*, 2016). Diante disso, o controle biológico pode ser considerado a alternativa mais adequada para o combate de *U. velinus* em áreas urbanas. Contudo atualmente não há nenhum produto oficialmente registrado para o controle desse lepidóptero (LIMA NETO *et al.*, 2016).

No controle biológico de lepidópteros-pragas é comum o uso de bactérias entomopatogênicas, particularmente *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* com alta eficiência (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), e que no caso de *U. velinus* já demonstrou conferir letalidade em condições de laboratório (NOGUEIRA; HABIB, 2001; NOGUEIRA; HABIB, 2002; SILVA; CARVALHO, 2004; LIMA NETO *et al.*, 2016). Todavia, quando se pretende controlar larvas de Lepidoptera com bactérias, onde a ingestão é necessária, exigem-se certos cuidados, como a época certa da aplicação de produtos controladores, uma vez que quando as lagartas estão próximas a empupar tendem a diminuir ou paralisar sua alimentação. Por outro lado, como os fungos entomopatogênicos atuam por contato, não sendo necessária a ingestão, sua ação pode ocorrer sobre os diferentes instares larvais, inclusive os que antecedem o período pupal (ALVES, 1998).

Em decorrência da alta aptidão das lagartas de *U. velinus* promoverem desfolhas significativas na copa dessa árvore, e também da capacidade desse hesperiídeo desenvolver-se e provocar danos em outras espécies vegetais com importância econômica (WENDT; CARVALHO, 2001; NADAI; TREVISAN; CARVALHO, 2002; NADAI *et al.*, 2003; SILVA; CARVALHO, 2004; WENDET; CARVALHO, 2006; TREVISAN, 2014; ROCHA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019), consideram-se necessárias pesquisas que avaliem e aprimorem métodos de controle deste lepidóptero-praga que sejam adaptadas para o manejo em ambiente urbano, tal como o uso de fungos e bactérias entomopatogênicas. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a ação patogênica de três espécies de fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Cladosporium* sp. da Agribio®) e dois produtos biológicos a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillusbio® e Dipel®) em lagartas de 4º instar de *U. velinus*, mantidas em condições laboratoriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROCEDÊNCIA DOS INSETOS EXPERIMENTAIS

Folículos de *C. fairchildiana*, presentes no campus de Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (22°45'S, 43°41'W; 33 metros de altitude), contendo ovos de *U. velinus* foram

coletados, manualmente em março, mês que habitualmente ocorrem surtos populacionais desse inseto. Os folíolos coletados foram levados para o Centro Integrado do Manejo de Pragas (CIMP) da UFRRJ.

Em laboratório foi realizada a triagem dos ovos com base na coloração para segregar posturas recentes das mais velhas. Os folíolos com ovos férteis, de coloração amarelada (postura recente), foram acondicionados em caixas plásticas transparentes do tipo gerbox com tampa (11,0 cm x 11,0 cm x 3,5 cm) forradas com papel filtro. As caixas contendo os ovos foram mantidas em condições ambientais controladas de temperatura e umidade relativa do ar (26 ± 1 °C, $80 \pm 1\%$ de UR).

Diariamente foram realizadas observações para determinar o dia da eclosão das lagartas e mudança para o 2º instar. Quando no 2º instar, as lagartas foram separadas em grupos de 10 indivíduos e transferidas para potes plásticos transparentes de 1L, com fundo revestido com papel filtro e com tampa perfuradas para permitir a circulação de ar e mantidas em condições ambientais controladas (26 ± 1 °C, $80 \pm 1\%$ de UR). As lagartas foram alimentadas *ad libitum* diariamente com folíolos novos de sombreiro (TREVISAN *et al.*, 2004), sendo estes previamente lavados em água corrente e secos com papel absorvente. Na mesma ocasião, procedia-se também à limpeza dos potes através da substituição do papel filtro e retirada dos restos dos folíolos e fezes. O acompanhamento das mudas até o quarto instar era realizado pela inspeção da troca de cutícula da capsula cefálica. Quando atingido o quarto instar, as lagartas foram submetidas aos bioensaios.

2.2 PROCEDÊNCIA DOS ENTOMOPATÓGENOS

Foram considerados nos bioensaios três produtos biológicos com fungo entomopatogênico e comercializados pela empresa Agribio Defensivos Alternativos Ltda. (Seropédica, RJ): Beauveribio® (*B. bassiana*), Metabio® (*M. anisopliae*) e Cladosbio® (*Cladosporium* sp.), todos com a concentração de 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) viáveis mL⁻¹; e dois produtos biológicos comerciais a base da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem HD-1: Dipel WP® da Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda. (formulação pó molhável, com mínimo de 25 bilhões de esporos (UFC) viáveis g⁻¹) e Bacillusbio® da Agribio (formulação líquida, com 10^9 UFC viáveis mL⁻¹). A viabilidade das UFC dos conídios dos fungos entomopatogênicos e dos esporos de *B. thuringiensis* foi de 100%, seguindo metodologia descrita por Marques *et al.* (2000) e Alves *et al.* (2001), respectivamente.

2.3 BIOENSAIO

O bioensaio aconteceu no laboratório da Estação Experimental de Seropédica da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio).

As lagartas de 4º instar foram acondicionadas em potes plásticos de 1L (10 lagartas/pote) com tampa perfurada para permitir a circulação de ar, sendo quarenta lagartas por tratamento, totalizando 240 lagartas.

Inicialmente preparou-se uma solução com água destilada de Tween 80® (agente emulsionante) a 0,05%. As caldas contendo cada produto foram então preparadas com 95 mL da solução de Tween 80® + 5 mL de produto comercial quando na formulação líquida (Beauveribio®, Metabio®, Cladosbio® e Bacillusbio®) e 200 mg do Dipel® diluído em água destilada, resultando em suspensão com concentração de $5,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ para todos os produtos. O tratamento testemunha correspondeu a 100 mL da solução de Tween 80®.

A calda de cada tratamento foi aplicada por meio de um pulverizador manual com vasilhame de 600 mL de capacidade, sendo usado um vasilhame para cada tratamento, e acoplado a um compressor regulado à pressão de 15lb/pol², propiciando aplicação de 1,5 a 2,0 mg de calda/cm², de acordo com as recomendações da “International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants” (IOBC) (HASSAN, 1994).

Foram aplicados três jatos dos produtos testados (10 mL), a uma distância de 20 cm, sobre as lagartas de 4º instar contidas dentro de cada pote, sendo o excesso de produto retirado com papel absorvente. Após a aplicação, as lagartas foram mantidas nos próprios potes, sendo estes novamente fechados com tampas perfuradas. As lagartas foram alimentadas *ad libitum* com folíolos novos de sombreiros higienizados com água destilada e secadas com papel filtro, e então acondicionadas em câmara climatizada, onde foram mantidas a 25 ± 1 °C, $80 \pm 1\%$ de UR e no escuro por sete dias.

As observações para registro de letalidade foram realizadas a cada 24 horas durante sete dias. A cada observação, havendo lagartas mortas, estas foram removidas e novas folhas de sombreiro foram ofertadas às lagartas vivas. As lagartas mortas tratadas com produtos a base de fungo foram desinfetadas por 30 segundos em álcool 70%, enxaguadas em água destilada e estéril, secas em papel de filtro esterilizado, sendo cada lagarta desinfetada acondicionada em uma placa de *Petri* com algodão umedecido e envolvida com filme transparente de PVC. Foram submetidas à câmara úmida com 25 ± 1 °C, $80 \pm 1\%$ de UR e no escuro por 10 dias para verificar a extrusão do fungo e confirmação da mortalidade por esse agente. Para certificação da infecção pelos fungos entomopatogênicos testados, estruturas dos fungos que cobriam a superfície de cada inseto que exibiu conidiogênese foram retiradas com agulha fina, transferidas para lâmina microscópica contendo uma gota do corante lactofenol azul-de-algodão e observadas em microscópio ótico para identificação dos fungos com base em características morfológicas dos conidióforos e conídios, seguindo chave de Alves *et al.* (1998a).

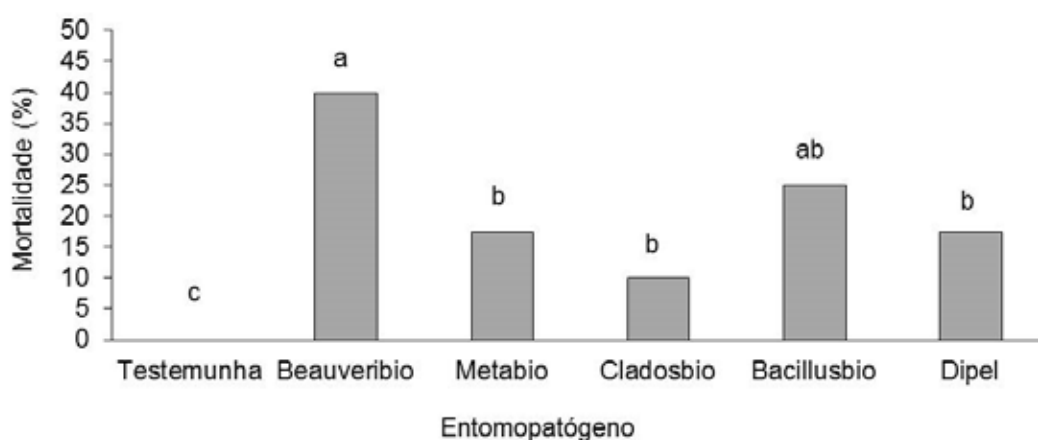
As lagartas mortas oriundas do tratamento com produtos a base da bactéria também receberam o mesmo tipo de desinfecção em relação às tratadas com produtos fúngicos. Contudo, a confirmação da mortalidade pelos produtos bacterianos foi realizada por meio da maceração de cada indivíduo morto num gral com pistilo de porcelana, onde se misturou a 2 mL água destilada. Posteriormente, a mistura foi coada e uma alíquota da mesma foi observada em lâmina microscópica para a verificação da presença de células bacterianas típicas de *B. thuringiensis*, seguindo metodologia de coloração diferencial descrita por Alves *et al.* (1998b).

Para cada produto foi calculada a mortalidade confirmada em 24 horas [= (número de indivíduos mortos nas primeiras 24 horas de observação/número total de indivíduos)*100] e a mortalidade acumulada [= (número de indivíduos mortos durante os sete dias de observação/número total de indivíduos)*100].

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e quatro repetições (10 lagartas/repetição). Os pressupostos de homocedasticidade e normalidade dos dados foram verificados, respectivamente, pelo teste de Cochran e Lilliefors a 5%, não havendo necessidade de transformação dos dados. Os dados originais foram submetidos à análise de variância, sendo as médias separadas pelo teste de Scott-Knott (P & 0,05), utilizando o pacote estatístico R, versão 2.15.0 (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras 24 horas após a aplicação dos cinco entomopatógenos observou-se que a maior mortalidade de lagartas de *U. velinus* ocorreu no tratamento com Beauveribio[®], embora não tenha diferido significativamente das que receberam Bacillusbio[®]. A aplicação de Beauveribio[®] causou mortalidade nas lagartas após 24 horas, superior quando comparado com a aplicação de Metabio[®], Cladosbio[®] e Dipel[®]. Ressalta-se que a mortalidade conferida pela aplicação dos cinco entomopatógenos diferiu estatisticamente da testemunha (Figura 1). Esse resultado revela que todos os produtos considerados neste experimento demonstram ocasionar letalidade às larvas de *U. velinus*, após 24 horas da aplicação, em condições de laboratório.



Letras diferentes, entre barras, expressam diferença significativa (Scott-Knott, $P \leq 0,05$).

Figura 1. Mortalidade de lagartas de quarto instar de *Urbanus velinus* após 24 horas do tratamento com cinco entomopatógenos.

Levando em consideração a avaliação da mortalidade acumulada, calculada após sete dias da aplicação dos entomopatógenos, somente o produto Metabio[®] causou 100% de mortalidade na população, não permitindo que houvesse lagartas completando o ciclo biológico. No entanto, em relação aos outros entomopatógenos registrou-se a presença de algumas larvas que empuparam e geraram adultos ao fim do bioensaio, embora a porcentagem de mortalidade dos tratamentos tenha diferenciado somente em relação à testemunha (Figura 2).

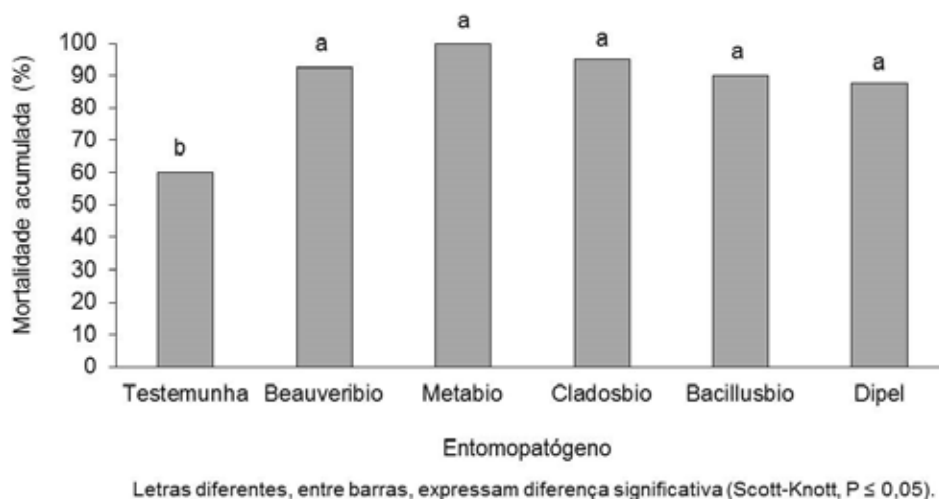


Figura 2. Mortalidade acumulada de lagartas de *Urbanus velinus* após o sétimo dia da aplicação de cinco entomopatógenos.

Embora tenham sido registrados alguns percentuais significativamente distintos de mortalidade larval após 24 horas do tratamento com os entomopatógenos (Figura 1), notou-se que esses valores apresentaram aumento no período de 72 horas e mantiveram-se estáveis até 120 horas após as aplicações. Após esse período, foram observadas taxas de mortalidade larval em ascensão em todos os tratamentos, atingindo o ápice 168 horas após a aplicação. Porém, em relação ao produto Dipel® registrou-se pouca variação na mortalidade larval, pois essas taxas se apresentaram as mais altas do bioensaio logo após 48 horas da aplicação (75%), sendo superadas somente após 144 horas (Figura 3). Desse modo, esses resultados sugerem, na sua maioria, que embora os entomopatógenos proporcionem taxas de mortalidade larval distintas em *U. velinus*, logo nas primeiras horas após a aplicação, esses valores tendem a crescer expressivamente somente após 120 horas e se igualam estatisticamente em 168 horas após o tratamento (Figura 3). No entanto, por ser um ensaio laboratorial não se pode afirmar que em condições de campo esse padrão também ocorrerá. Cabe ainda evidenciar que após 120 horas as lagartas do grupo controle também apresentaram mortalidade em ascensão, devendo-se considerar que a manipulação dos indivíduos em laboratório pode provocar estresse e consequente mortalidade. Nesse sentido, evidencia-se que esta variável atuava igualmente em todos os tratamentos.

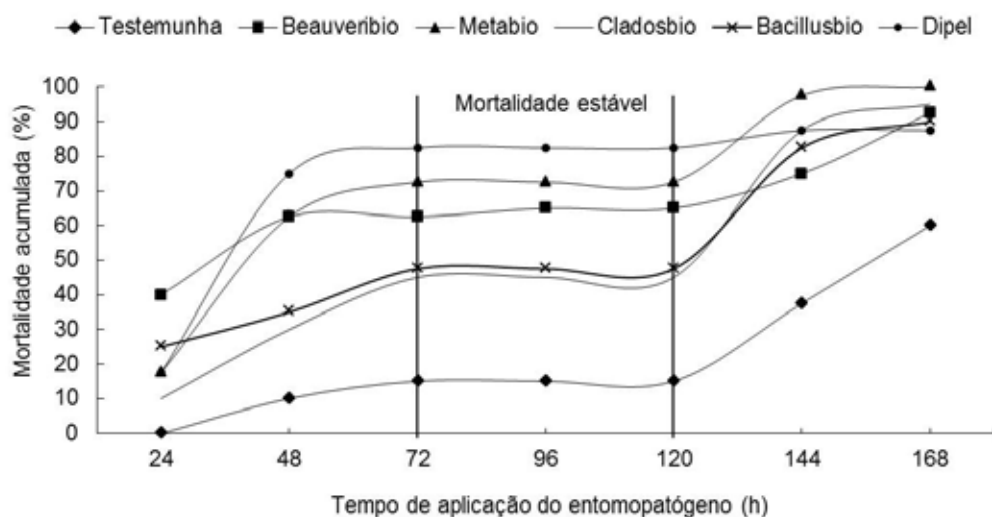


Figura 3. Percentual de mortalidade acumulada de lagartas de quarto instar de *Urbanus velinus*, submetidas ao tratamento com cinco entomopatógenos, no período entre 24 a 168 horas.

Diversos trabalhos relatam a superior patogenicidade de *M. anisopliae* nas espécies de Lepidoptera, em relação a outros fungos entomopatogênicos. No entanto, devido à inexistência de trabalhos que avaliam especificamente a susceptibilidade de *U. velinus* a esses fungos, torna-se inviável uma comparação direta.

Por outro lado, considerando-se outras espécies de Lepidoptera, podem-se apontar os resultados de estudos onde se avaliou a mortalidade provocada por esse grupo de entomopatógenos. Nesse contexto, Bahar *et al.* (2011) ao submeterem ovos e lagartas de 1º instar de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a uma solução de 1×10^8 esporos mL⁻¹ de *Cladosporium* sp. obtiveram 64% de falha na eclosão e 54% de mortalidade após o quarto e quinto dias da aplicação, respectivamente. Amatuzzi (2014) registrou mortalidade de 43% e 68%, para dois diferentes isolados de *Cladosporium* sp., quando aplicado sob lagartas de 3º instar de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) após oito dias. Contudo, o presente estudo demonstrou que a aplicação de *Cladosporium* sp. proporcionou mortalidade de 95% nas lagartas de 4º instar de *U. velinus* após o sétimo dia da aplicação, apresentando indícios que esse micro-organismo pode ser eficiente no controle desse hesperiídeo.

Em relação à *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foi verificado que as lagartas do curuquerê-do-algodoeiro [*Alabama argillacea* (Huebner) (Lepidoptera: Noctuidae)] submetidas à aplicação desses fungos registraram 70% de mortalidade 10 dias após a aplicação (CÉSAR FILHO; MARQUES; BARROS, 2002). Comparando-se com a mortalidade registrada nesse trabalho, que foi de 90% após sete dias de avaliação, pode-se apontar que *U. velinus* seja mais suscetível a esses fungos que *A. argillacea*.

Ainda, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) quando tratada com *B. bassiana* e *M. anisopliae* demonstrou ser mais suscetível à *M. anisopliae* (SILVA *et al.*, 2003), sinalizando, portanto, a possibilidade desse fungo ser o mais eficiente no controle desse inseto. Contudo, no presente estudo, após 24h da aplicação foi observada uma mortalidade significativamente maior quando utilizado *B. bassiana*. Oliveira *et al.* (2008), investigando os efeitos de diferentes concentrações desses mesmos fungos, em condições de laboratório, sobre a mortalidade de larvas de terceiro instar de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae), observaram que a concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ proporcionou 43% de mortalidade. Contudo,

Araújo Júnior *et al.* (2020) ao submeterem lagartas de terceiro instar de *D. saccharalis* a diferentes dosagens de *M. anisopliae* (10^7 conídios.g⁻¹) obtiveram mortalidade de aproximadamente 10% em ambos os casos. Resultados esses que corroboram em partes com registros do presente estudo, referente à avaliação após 24 horas, onde as lagartas de *U. velinus* submetidas a *B. bassiana* apresentaram 40% de mortalidade e de 17,5% quando submetidas a *M. anisopliae*.

Pereira *et al.* (2012), avaliando a ocorrência natural de fungos entomopatogênicos em reflorestamento de *Eucalyptus* sp., coletados diretamente em insetos-pragas, vivos e mortos, em condições de campo, registraram a ocorrência de diversos fungos endofíticos, dentre estes, *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Concluíram que a grande diversidade de organismos entomopatogênicos presentes no campo evidencia uma aparente e interminável fonte de matéria-prima para bioinseticidas, e que o uso desse tipo de fungo consistirá em uma estratégia promissora para o manejo de insetos-pragas em áreas florestais. Diante disso e em face da letalidade desses fungos às lagartas de *U. velinus*, observada nesse trabalho em condições de laboratório, e que seu hospedeiro típico trata-se de uma árvore amplamente utilizada em arborização, é cabível considerar a hipótese de que esse grupo de micro-organismo possa ser testado como estratégia no combate a essa praga, inclusive em ambiente urbano. Com isso, cabe ressaltar que *B. bassiana* e *M. anisopliae* conferiram mortalidade estatisticamente igual à observada em lagartas que se alimentaram de folhas tratadas com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após 24 horas e que os produtos inseticidas fabricados com essa bactéria são tradicionalmente empregados no controle de lagartas.

174 No contexto da avaliação dessa bactéria como um entomopatógeno, Nogueira e Habib (2001) observaram, também em condições de laboratório, mortalidade superior à reportada neste trabalho, 50%, para lagartas de 4º instar de *U. velinus*, após 37,18 horas depois de receberem *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, numa dosagem de 17,40 UI/cm². Esses autores relatam ainda que quando a aplicação desse entomopatógeno foi realizada no início do quinto instar, o tempo de resposta para proporcionar 50% de mortalidade foi reduzido para 28 horas. Dessa forma, esse registro pode ser entendido pelo fato de que a afecção das lagartas pela bactéria *B. thuringiensis* só é possível após esse micro-organismo ser ingerido, via alimentação larval e, segundo Trevisan *et al.* (2004), o quinto instar de *U. velinus* corresponde ao período em que a lagarta consome em torno de 80% de todo alimento consumido na fase larval. Diante dessa discussão pode-se sugerir que o início do quinto instar de *U. velinus* é o momento do ciclo biológico mais adequado à aplicação de bioinseticidas derivados de *B. thuringiensis*, no sentido de elevar a mortalidade e diminuir o tempo de resposta. Apoiando essa hipótese, Silva e Carvalho (2004) observaram mortalidade de 37,5% no terceiro instar de *U. velinus* e 67,5% no quinto, após 24 horas da aplicação de *B. thuringiensis*, a uma dosagem de 750g/ha. Ainda nesse contexto, Lima Neto *et al.* (2016) informam sobre a necessidade de se entender aspectos voltados para o controle de lagartas de *U. velinus*, de quarto e quinto instares, em função dos danos proporcionados durante essas fases.

No entanto, cabe esclarecer que o modo de ação dos entomopatógenos considerados nesse experimento, fungo e bactéria, é distinto. Uma vez que o primeiro age por contato, isto é, penetra no tegumento do inseto (COSTA; D'AVILA; CANTARELLI, 2011), o segundo precisa ser ingerido (HABIB; ANDRADE, 1998). Os fungos são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados às bactérias que só atuam no inseto se forem ingeridas

durante a alimentação (ALVES, 1998). Diante dessa característica e uma vez que foram ofertadas folhas novas diariamente, e admitindo-se que as lagartas priorizavam as folhas recém colhidas, deve-se considerar, no entanto, que essa condição possa influenciar negativamente na ação entomopatogênica de *B. thuringiensis*, refletindo na mortalidade proporcionada por esse produto. Ainda, embora existam relatos de que lagartas de Lepidoptera sejam mais susceptíveis a micro-organismos entomopatogênicos nos primeiros instares larvais e menos nos instares posteriores (BAHAR *et al.*, 2011), deve-se, no caso de *U. velinus*, considerar os relatos realizados por esse trabalho e os reportados por Nogueira e Habib (2001) e Silva e Carvalho (2004). Desse modo, são evidenciadas informações que sinalizam a alta patogenicidade à *B. thuringiensis*, de lagartas desse hesperiídeo, estando em instares próximos ao período de pupação, inclusive, segundo Silva e Carvalho (2004) demonstrando superior mortalidade quando o bioinseticida é aplicado durante essa fase, em relação à fase anterior.

Adicionalmente, sobre a ação de *B. thuringiensis* em Lepidoptera, se faz importante esclarecer que os cristais tóxicos por esse micro-organismo produzidos, ao serem ingeridos pelas larvas, sofrem ação do pH intestinal e de proteases, que solubilizam o cristal e ativam as toxinas (proteínas Cry). As toxinas se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino médio das larvas, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana e ocasionam a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que intumescce e rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele do inseto. Em consequência, a larva para de se alimentar, torna-se imóvel e morre por inanição ou septicemia (KNOWLES, 1994; COPPING; MENN, 2000; PRAÇA *et al.*, 2004), sendo um grande número de insetos pragas suscetíveis às proteínas Cry (VAN FRANKENHUYZEN, 2013). Por outro lado, mesmo sendo estudados e utilizados como biopesticidas há mais de meio século e com claras indicações de serem menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos e não prejudiciais aos seres humanos, os produtos à base de *B. thuringiensis* nunca ocuparam um lugar de destaque no mercado de vendas de inseticidas, principalmente por problemas relacionados com a perda de estabilidade, a ausência de translocação nas plantas e degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (NAVON, 2000).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Lagartas de 4º instar de *U. velinus* são susceptíveis à atuação patogênica de formulações comerciais a base dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Cladosporium* sp., e da bactéria *B. thuringiensis*, em condições de laboratório, em função do tempo de aplicação do bioinseticida. A aplicação de Beauveribio® após 24 horas é mais eficiente para controlar lagartas de *U. velinus*, em relação a aplicação de Metabio®, Cladosbio® e Dipel®, considerando esse tempo de ação. Dipel® demonstra ser mais letal no período de ação correspondente a 48 e 120 horas, proporcionando a morte do maior número de lagartas, nesse intervalo de tempo. Após 168 horas da aplicação dos cinco bioinseticidas, a mortalidade das lagartas de *U. velinus* é equivalente, sinalizando que após esse período os produtos apresentam eficiência análoga. Fazem-se necessários experimentos em condições de campo para avaliar a eficiência do controle de *U. velinus*, tendo em vista os promissores indícios apontados neste trabalho.

5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro e sexto autores (CAPES - Código de Financiamento 001), à empresa Agribio Defensivos Alternativos Ltda. pela concessão dos produtos biológicos testados, à Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio) e ao Centro Integrado de Manejo de Pragas (CIMP)/UFRRJ pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; AUGUSTO, N. T. Estabilidade de uma formulação de *Bacillus sphaericus* armazenada sob diferentes temperaturas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 21-26, jan./mar. 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000100004>.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JUNIOR, A.; ALVES, L. Francisco A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. p. 637-711.
- ALVES, S. B.; FERRAZ, L. C. C. B.; CASTELLO BRANCO JR., A. Chaves de identificação de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b. p. 1039-1074.
- AMATUZZI, R. F. **Fungos endofíticos do morangueiro e potencial de controle biológico de *Duponchella fovealis* Zeller** (Lepidoptera: Crambidae). 2014. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2014.
- ARAÚJO JUNIOR, J. V. *et al.* Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre formas jovens da broca da cana-de-açúcar. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 475-486, abr./jun. 2020. DOI: 10.17765/2176-9168.2020v13n2p475-486.
- AUSTIN, G. Hesperiidae of Rondônia Brazil: *Ridens* and the "Proteus" group of *Urbanus*, with descriptions of new species (Pyrginae). **Journal of the Lepidopterists Society**, San Francisco, v. 52, n. 2, p. 166-176, 1998.
- BAHAR, M. H.; BACKHOUSE, D.; GREGG, P. C.; MENSAH, R. Efficacy of a *Cladosporium* sp. fungus against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), other insect pests and beneficial insects of cotton. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 21, n. 12, p. 1387-1397, dez. 2011. DOI: 10.1080/09583157.2011.622036
- CÉSAR FILHO, E.; MARQUES, E. J.; BARROS, R. Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) isolates to control *Alabama argillacea* (Huebner) caterpillars. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 457-462, jul./set. 2002. DOI: 10.1590/S0103-90162002000300008.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Nova Jersey, v. 56, p. 651-676, jul. 2000.
- COSTA, E. C.; D'AVILA, M.; CANTARELLI, E. B. **Entomologia florestal**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. *In*: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

HASSAN, S. A. *et al.* Result of the sixth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS - working group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Entomophaga**, v. 39, n. 1, p. 107-119, 1994.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, n. 8, p. 275-308, 1994.

LIMA NETO, J. E.; ROLIM, G. G.; MARIA, S. L. S.; WATANABE, S. Y. M.; SIQUEIRA, H. A. A. Toxicidade de *Bacillus thuringiensis aizawai* e inseticidas reguladores de crescimento para *Urbanus acauoios* Willams (1926). **Caderno de Ciências Agrárias**, Montes Claros, v. 8, n. 3, p. 63-67, mar. 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MARQUES, E. J.; ALVES, S. B.; MARQUES, I. M. R. Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 303-307, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000200012>.

NADAI, J.; TREVISAN, H.; CARVALHO, A. G. Consumo de área foliar de *Urbanus acauoios* (Lepidoptera: Hesperidae) em feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*). **Revista Universidade Rural**, Seropédica, v. 22, n. 2, p. 137-140, jul./dez. 2002.

NADAI, J.; TREVISAN, H.; LUNZ, A. M.; CARVALHO, A. G. Desenvolvimento de *Urbanus acauoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae), praga em arborização urbana, em duas cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biotemas**, Santa Catarina, v. 16, n. 2, p. 77-88, abr./jun. 2003.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection-reality and prospects. **Crop Protection**, London, v. 19, p. 669-676, set. 2000. DOI: 10.1016/S0261-2194(00)00089-2.

NOGUEIRA, M. D.; HABIB, M. E. M. Biologia e controle microbiano de *Urbanus acauoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae): II. Patologia e susceptibilidade em larvas infectadas por *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (H-3a:3b). **Acta Amazonica**, Manaus, n. 31, v. 4, p. 655-659, out./dez. 2001.

NOGUEIRA, M. D.; HABIB, M. E. M. Biologia e controle microbiano de *Urbanus acauoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae): I. Descrição morfológica e aspectos bio-ecológicos. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 32, n. 1, p. 123-132, jan./mar. 2002.

OLIVEIRA, M. A. P. *et al.* Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, abr./jun. 2008. DOI: 10.4025/actasciobiols.v30i2.3627.

PEREIRA, R. C. *et al.* Fungos entomopatogênicos infectando pragas florestais. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24., 2012, Curitiba. **Anais [...]** Curitiba: Sociedade Entomológica do Brasil, 2012. 1 CD.

PRAÇA, L. B. *et al.* Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, jan. 2004.

R CORE DEVELOPMENT TEAM. The R project for statistical computing. Versão 2.15.0. [Vienna]: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 22 jun. 2020.

ROCHA, C. V. S. *et al.* Análise da influência de sete genótipos de Fabaceae sobre a duração e mortalidade da fase larval de *Urbanus velinus* (Plötz, 1880) (Lepidoptera: Hesperidae). *In*: SIMPÓSIO DE FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA, 2019. **Anais [...]** Seropédica: Simpósio de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2019. p. 12.

SANTOS, C. A. A. *et al.* Primeiro registro de *Canavalia ensiformis* e *Phaseolus lunatus* como planta hospedeira de *Urbanus velinus* (Lepidoptera: Hesperidae). *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ENTOMOLOGIA, 6., 2019. **Anais [...]** Viçosa: VI Simpósio Internacional de Entomologia, 2019. p. 1.

SILVA, E. J.; CARVALHO, A. G. Influência de *Clitoria fairchildiana*, *Desmodium incanum* e *Galactia striata* (Leguminosae) na biologia de *Urbanus acawoios* (Lepidoptera: Hesperidae). **Quebracho**, v. 11, p. 33-41, dec. 2004.

SILVA, L. K. F.; CARVALHO, A. G. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1909) em lagartas de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera, Hesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 249-252, abr./jun. 2004.

SILVA, V. C. A.; BARROS, R.; MARQUES, E. J.; TORRES, J. B. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 653-658, oct./dec. 2003.

TREVISAN, H. **Avaliação do efeito de plantas transgênicas em Lepidoptera**: análises da influência da soja RR na biologia de *Urbanus acawoios* e do pólen do milho Bt em *Galleria mellonella*. Beau Bassin: Novas edições acadêmicas. 2014.

TREVISAN, H. *et al.* Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lep.: Hesperidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 1-4, jan./fev. 2004. DOI: 10.1590/S0103-84782004000100001.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 76-85, set. 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2013.05.010.

WENTD, J. G. N.; CARVALHO, A. G. Biologia e consumo foliar por *Urbanus esmeraldus* Butler (Lepidoptera: Hesperidae) em três espécies da família Leguminosae. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n. 1, p. 11-17, jan./dez. 2001.

WENTD, J. G. N.; CARVALHO, A. G. Consumo foliar de *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae) por *Urbanus acawoios* Williams, 1926 (Lepidoptera: Hesperidae). **Biotemas**, Santa Catarina, v. 19, n. 1, p. 19-23, jan./mar. 2006.