

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

ZAIRA VIEIRA CALDEIRA

TOXICIDADE E REPELÊNCIA DO ÓLEO DE NEEM AO ENDOPARASITOIDE
***Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

2023

ZAIRA VIEIRA CALDEIRA

TOXICIDADE E REPELÊNCIA DO ÓLEO DE NEEM AO ENDOPARASITOIDE
Testrastichus howardi (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares
Coorientador: Dr. Ronnie Von dos Santos Veloso

DIAMANTINA
MINAS GERAIS - BRASIL
2023

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

C146t Caldeira, Zaira Vieira
2023 TOXICIDADE E REPELÊNCIA DO ÓLEO DE NEEM AO ENDOPARASITOIDE
Tetrastichus howardi (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) [manuscrito] /
Zaira Vieira Caldeira. -- Diamantina, 2023.
43 p.

Orientador: Prof. Marcus Alvarenga Soares.

Coorientador: Prof. Ronnie Von dos Santos Veloso.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -- Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-
Graduação em Produção Vegetal, Diamantina, 2023.

1. Controle biológico. 2. Controle químico. 3. Inseticida
botânico. 4. Manejo Integrado de Pragas. 5. Parasitoide. I.
Soares, Marcus Alvarenga. II. Veloso, Ronnie Von dos Santos.
III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-
2886
e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM


**Toxicidade e repelência do óleo de neem ao endoparasitoide
Tetrastichus howardi (Hymenoptera: Eulophidae)**

Tese apresentada ao DOUTORADO
EM PRODUÇÃO VEGETAL, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM PRODUÇÃO
VEGETAL


Orientador (a): Prof. Dr. Marcus
Alvarenga Soares

Coorientador: Ronnie Von Dos Santos
Velooso


Data da aprovação : 14/08/2023

Documento assinado digitalmente
 MARCUS ALVARENGA SOARES
Data: 15/08/2023 13:42:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.Dr. MARCUS ALVARENGA SOARES - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 RONNIE VON DOS SANTOS VELOSO
Data: 15/08/2023 20:51:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. RONNIE VON DOS SANTOS VELOSO - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 GILSON GERALDO SOARES DE OLIVEIRA JUNIOR
Data: 14/08/2023 23:27:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. GILSON GERALDO SOARES DE OLIVEIRA JUNIOR - UFVJM

Documento assinado digitalmente
 ANETE PEDRO LOURENÇO
Data: 15/08/2023 08:19:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr.^a ANETE PEDRO LOURENÇO - UFVJM

OFEREÇO

*A Deus por estar sempre ao meu lado
me dando forças para seguir.*

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Helena e Jackson
Ao meu filho Joaquim
Ao meu esposo Jhonathan*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar ao meu lado, por ser o meu melhor amigo, por me guiar na caminhada e não me deixar desanimar. A Ti toda Honra e toda Glória!

À minha Mãezinha Nossa Senhora, por sempre interceder a Deus por mim, e estar ao meu lado durante a caminhada;

Aos meus pais Helena e Jackson, por todo amor, cuidado, compreensão e amizade. Por serem os primeiros a acreditar em mim, na minha capacidade e sucesso;

Aos meus irmãos Daniela e Álvaro, por todo amor e amizade, por sempre estarem presentes, mesmo que distantes em quilômetros;

Ao meu filho Joaquim, que ainda no “forninho”, se tornou o motivo para eu acordar todas as manhãs e lutar pelos meus objetivos e sonhos;

Ao meu esposo Jhonathan, presente de Deus em minha vida, por sempre estar ao meu lado, sempre me incentivar e me reanimar quando o desânimo e o sentimento de incapacidade apareciam;

À minha gatinha Bibi, por ser minha companheira e companhia diária;

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), por me acolher durante 11 anos, e pela oportunidade de realizar essa e outras pesquisas, durante minha trajetória na instituição desde a graduação em Agronomia;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFVJM (PPGPV), pela oportunidade de realizar o doutorado e contribuir para a ciência brasileira;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador Marcus Alvarenga, por ser mais que um orientador, por todos os ensinamentos durante essa trajetória, por confiar e acreditar em mim;

Ao meu coorientador Ronnie, por toda contribuição no desenvolvimento do trabalho, e por todas as prosas e transferência de sabedoria;

A todos os professores, funcionários e colaboradores do PPGPV que fizeram parte dessa trajetória;

A todos os amigos do Núcleo de Estudos em Manejo Integrado de Pragas (NEMIP) e do Núcleo de Estudos em Entomologia Florestal (NEEF) da UFVJM, pelo conhecimento compartilhado;

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFVJM, pelas prosas e contribuição no desenvolvimento da minha pesquisa;

Aos amigos de longa data, que não vou citar nomes, mas vocês sabem quem vocês são. A amizade de vocês é fundamental para cada fase da minha vida, inclusive essa do doutorado;

Aos amigos da Renovação Carismática Católica e do Ministério de Música de Diamantina, pela amizade e orações;

À toda minha família e a família do meu esposo que hoje é minha também, por sempre torcerem por mim;

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e conclusão dessa etapa em minha vida, a minha gratidão!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

ZAIRA VIEIRA CALDEIRA. **TOXICIDADE E REPELÊNCIA DO ÓLEO DE NEEM AO ENDOPARASITOIDE *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**. 2023. 43p. (Tese - Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2023.

Inseticidas botânicos podem não ser inócuos a organismos benéficos, sendo importantes os trabalhos que estudam a seletividade desses produtos a inimigos naturais. O objeto foi avaliar a seletividade do óleo de neem ao endoparasitoide de larvas e pupas *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) após diferentes formas de exposição. Foram realizados quatro bioensaios no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFVJM. No bioensaio I, as fêmeas de *T. howardi* foram expostas de forma aguda ao óleo de neem, e após 24h de exposição foi avaliada a mortalidade dos parasitoides e confeccionada a curva dose-resposta e as CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₉ foram estimadas. No bioensaio II, fêmeas do parasitoide foram expostas de forma aguda às CL₁₀ e CL₅₀, e após 24h foram ofertadas pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) para o parasitismo por 48h, para serem avaliados o índice de parasitismo, longevidade, emergência, razão sexual, período ovo-adulto, e morfometria das gerações parental e F1. No bioensaio III, foi avaliada a preferência de fêmeas de *T. howardi* por local contaminado ou não pelo óleo de neem, para verificação da repelência da azadiractina a esse organismo. No bioensaio IV, as fêmeas de *T. howardi* foram expostas ao óleo de neem de forma multi (grupo I) e transgeracional (grupo II). No grupo I as gerações parental, F1, F2 e F3 tiveram contato com pupas de *T. molitor* contaminadas pelo neem, no grupo II apenas a geração parental teve contato com pupas contaminadas, para avaliação dos mesmos aspectos biológicos do bioensaio II. A relação dose-resposta e as concentrações letais foram obtidas a partir do modelo logaritmo logístico. Os dados biológicos foram submetidos aos pressupostos da análise paramétrica. Quando atendidos, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ou Kruskal-Wallis a 5% de significância. A repelência foi avaliada pelo Teste de Qui-quadrado. A azadiractina não foi letal para *T. howardi*, no entanto provocou efeitos subletais em sua biologia. Também foi comprovada a repelência do inseticida ao parasitoide. Por tanto, não são recomendadas aplicações simultâneas do óleo de neem e *T. howardi* em programas de manejo integrado de pragas.

Palavras-chave: Azadiractina. Controle biológico. Inseticida botânico. Seletividade.

ABSTRACT

ZAIRA VIEIRA CALDEIRA. **TOXICITY AND REPELLENCE OF NEEM OIL TO THE ENDOPARASITOID *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**. 2023. 43p. (Thesis – Doctorate in Vegetable Production) – Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valley, Diamantina, 2023.

Botanical insecticides may not be innocuous to beneficial organisms, and studies that study the selectivity of these products to natural enemies are important. The objective was to evaluate the selectivity of neem oil to the endoparasitoid of larvae and pupae *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) after different forms of exposure. Four bioassays were carried out at the Laboratory of Biological Control of Insects at UFVJM. In bioassay I, *T. howardi* females were acutely exposed to neem oil, and after 24 hours of exposure, parasitoid mortality was evaluated and a dose-response curve was prepared and the LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₉ were estimated. In bioassay II, parasitoid females were acutely exposed to LC₁₀ and LC₅₀, and after 24h pupae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) were offered for parasitism for 48h, to evaluate the parasitism index, longevity, emergence, ratio sex, egg-to-adult period, and morphometry of the parental and F1 generations. In bioassay III, the preference of *T. howardi* females for a place contaminated or not by neem oil was evaluated, in order to verify the repellency of azadirachtin to this organism. In bioassay IV, *T. howardi* females were exposed to neem oil in a multi (group I) and transgenerational (group II) way. In group I, the parental generations, F1, F2 and F3 had contact with pupae of *T. molitor* contaminated by neem, in group II only the parental generation had contact with contaminated pupae, for the evaluation of the same biological aspects of bioassay II. The dose-response relationship and lethal concentrations were obtained from the logarithm model. Biological data were submitted to parametric analysis assumptions. When assisted, they were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and means compared by Tukey or Kruskal-Wallis test at 5% significance level. The repellency was evaluated by the Chi-square test. Azadirachtin was not lethal to *T. howardi*, however it caused sublethal effects in its biology. The repellency of the insecticide to the parasitoid was also proven. Therefore, simultaneous applications of neem oil and *T. howardi* in integrated pest management programs are not recommended.

Key words: Azadirachtin. Biological control. Botanical insecticide. Selectivity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	12
ARTIGO CIENTÍFICO I	21
TOXIDADE AGUDA DE ÓLEO DE NEEM E EFEITOS NA BIOLOGIA DE <i>Tetrastichus howardi</i> (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE).....	21
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Inseticida.....	20
2.2 Insetos (parasitoide e hospedeiro).....	20
2.3 Toxicidade aguda ao óleo de neem	20
2.4 Toxicidade da CL ₁₀ e CL ₅₀ na biologia de <i>T. howardi</i> após exposição aguda.....	21
2.5 Análise estatística	22
3 RESULTADOS	22
4 DISCUSSÃO	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	26
ARTIGO CIENTÍFICO II	30
REPELÊNCIA E EFEITOS SUBLETAIS DO ÓLEO DE NEEM AO PARASITOIDE <i>Tetrastichus howardi</i> (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE).....	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Inseticida.....	33
2.2 Insetos (parasitoide e hospedeiro).....	33
2.3 Repelência da CL ₅₀ do óleo de neem a <i>T. howardi</i>	33
2.4 Efeitos subletais da CL ₁₀ e CL ₅₀ do óleo de neem a <i>T. howardi</i> em exposição multi e transgeracional	33
2.5 Análise estatística	34
3 RESULTADOS	35
4 DISCUSSÃO.....	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	40

CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
----------------------------	----

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cerca de 67.000 espécies de organismos, dentre eles, insetos e ácaros, atacam as culturas agrônômicas, provocando redução de 10 a 16% da produção (PASCOLI et al., 2020). O controle dessas pragas é feito em sua maioria por meio do controle químico a base de inseticidas sintéticos de amplo espectro de ação, que são de fácil aquisição e eficientes no controle imediato desses organismos (PEREIRA; CALDEIRA; SOARES, 2016; TIAN et al., 2018). No entanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos pode provocar a contaminação ambiental, e favorecer o surgimento de pragas resistentes e secundárias, bem como sua ressurgência (HARMANCI et al., 2019; LEACH; HOEPTING; NAULT, 2019; PEREIRA; CALDEIRA; SOARES, 2016; TIAN et al., 2018). O desenvolvimento de programas de manejo integrado de pragas (MIP) pode reduzir esses efeitos (HARMANCI et al., 2019; KRELL et al., 2018; NAPOLEÃO et al., 2013). O MIP consiste em um sistema de apoio à tomada de decisão para a seleção e uso de táticas de controle de pragas, coordenadas de forma isolada ou harmoniosa em uma estratégia de gestão, com base em análises de custo/benefício que levem em conta os interesses e os impactos sobre os produtores, a sociedade e o meio ambiente (KOGAN, 1998).

Um dos pilares do MIP é o controle biológico, que consiste na utilização de inimigos naturais; tais como insetos predadores ou parasitoides e entomopatógenos, que se alimentam ou causam doenças em insetos herbívoros, contribuindo para o controle das populações de pragas (SOARES et al., 2009). Os parasitoides são importantes agentes, pois são eficientes no controle de seus hospedeiros e apresentam uma grande diversidade de espécies, destacando àquelas pertencentes às ordens Hymenoptera e Diptera (PEREIRA et al., 2008).

Tetrastichus howardi Olliff (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário de larvas e pupas, de lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros (KFIR; GOUWS; MOORE, 1993; PRÜTZ; BRINK; DETTNER, 2004). Em condições de campo parasita com eficiência larvas e pupas de *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae); *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae); *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae); *Erinnyis ello* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae); e *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). E em condições de laboratório, pode ser criado em larvas e pupas de *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae); *Oxydia vesulia* Cramer (Lepidoptera: Geometridae) e *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera:

Tenebrionidae), além de seu hospedeiro natural *D. saccharalis* (LA SALLE; POLASZEK 2007; SILVA-TORRES et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2003; BARBOSA et al., 2015; SIMONATO et al., 2020; PIÑEYRO et al., 2016; TIAGO et al., 2019; FAVORETO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2021). É um hiperparasitoide facultativo, podendo ter progênie que se desenvolve como parasitoide primário ou secundário (SULLIVAN; VÖLKL, 1999).

O controle químico de insetos pragas à base de inseticidas botânicos é também promissor, especialmente em conjunto com outros métodos de controle dentro do MIP (ZANUNCIO et al., 2016). Além disso, inseticidas botânicos apresentam vantagens em relação aos sintéticos, uma vez que são considerados seguros para humanos e meio ambiente pela rápida degradação ambiental e baixa toxicidade a mamíferos (MONSREAL-CEBALLOS et al., 2018; ALI et al., 2018; CUTHBERT et al., 2020; LAMPIRI et al., 2020).

Os óleos e extratos de neem são provenientes da árvore neem indiano (*Azadirachta indica* (A.) Juss.), pertencente à família Meliaceae, em suas cascas, frutos, folhas e principalmente sementes são encontrados mais de 100 compostos biológicos ativos, principalmente os terpenóides (CAMPOS et al., 2016; DUARTE et al., 2020). A azadiractina é o composto majoritário no neem e a principal molécula responsável pelo efeito inseticida dessa espécie (ZANUNCIO et al. 2016; GAI et al., 2011). Seus efeitos nos insetos podem decorrer da aplicação tópica, com o contato direto do inseto com a substância, ou por meio da alimentação (DE AZAMBUJA et al., 1991; ER; TAŞKIRAN, 2017; DUARTE et al., 2020). A azadiractina pode diminuir, ou até mesmo paralisar a alimentação dos insetos, e interferir em sua fisiologia. Pode provocar paralisias musculares, causar necrose das células do intestino médio, provocar a perda de células regenerativas do intestino, inibir a produção de enzimas intestinais, e causar efeitos no sistema endócrino do inseto. A azadiractina atinge também o sistema neurosecretor e isso provoca o bloqueio, por exemplo, do PTH (hormônio protoracicotrópico), que controla a função da glândula protorácica e da corpora alata, responsáveis pela formação de cutícula e da ecdise, e das quantidades de ecdisteroides e hormônio juvenil. Desta forma, os produtos à base de neem, podem provocar nos insetos, efeitos semelhantes aos provocados por inseticidas reguladores de crescimento e inibidores de quitina, como impedir que os insetos mudem de estágio. Tais efeitos podem ocorrer, tanto em ovos, jovens ou adultos. A azadiractina ainda pode inibir o desenvolvimento de órgãos reprodutivos e a vitelogênese que reduzem a fecundidade e fertilidade dos insetos (LUNTZ; NISBET, 2000; ER; TAŞKIRAN, 2017; KOVAŘÍKOVÁ; PAVELA, 2019).

No MIP, quando ocorre a associação do controle biológico com o químico, é fundamental que os inseticidas sejam seletivos aos inimigos naturais (PEREIRA;

CALDEIRA; SOARES, 2016). No entanto, produtos de origem botânica podem não ser inofensivos (MOSSA; MOHAFRASH; CHANDRASEKARAN, 2018). Alguns trabalhos tem apresentado efeitos prejudiciais do óleo de neem a parasitoides e polinizadores, como a redução da emergência e parasitismo das fêmeas da geração F1 de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (PARREIRA et al., 2018), mortalidade de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) por ingestão do neem (GOMES et al., 2020), efeito negativo na emergência de *Trichogramma chilonis* Ishii e *Trichogramma japonicum* Ashmead (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (SHARMA; AGGARWAL, 2019), e redução do número de indivíduos emergidos da geração F1 e na sobrevivência das gerações parental, F1 e F2 de *Palmistichus elaeisis* Delvare e Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae) (CALDEIRA et al., 2022).

Portanto, estudos que simulam a exposição aguda e crônica dos inimigos naturais às moléculas de inseticidas são importantes, para a avaliação da toxicidade dessas substâncias aos organismos não alvos, determinando sua seletividade ou não a esses insetos.

REFERÊNCIAS

- ALI, S., FAROOQI, M. A., SAJJAD, A., ULLAH, M. I., QURESHI, A. K., SIDDIQUE, B., WAHEED, W., SARFRAZ, M., ASGHAR, A. Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid, *Sitobion avenae* (Fab.) (Hemiptera: Aphididae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 97, 2018.
- BARBOSA, R. H., KASSAB, S. O., PEREIRA, F. F., ROSSONI, C., COSTA, D. P., BERNDT, M. A. Parasitism and biological aspects of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae) pupae. **Ciência Rural**, v. 45, p. 185-188, 2015.
- CALDEIRA, Z. V., SOARES, M. A., VELOSO, R. V. DOS S., SILVA, C. S., COSTA, S. P. E., SANTOS, M. M., SILVA, I. M., SILVA, W. M., ZANUNCIO, J. C. Acute and Chronic Toxicity of Neem Oil to the Endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 5, p. 1545-1550, 2022.
- CAMPOS, E. V., DE OLIVEIRA, J. L., PASCOLI, M., DE LIMA, R., FRACETO, L. F. Neem oil and crop protection: from now to the future. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1494, 2016.
- CUTHBERT, R. N., VONG, G. Y., PAOLACCI, S., DICK, J. T., CALLAGAN, A., COUGHLAN, N. E. Aquatic plant extracts and coverage mediate larval mosquito survivorship and development. **Biological Control**, p. 104263, 2020.

DE AZAMBUJA, P., GARCIA, E. S., RATCLIFFE, N. A., WARTHEN JR, J. D. Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. **Journal of Insect Physiology**, n. 37, v. 10, p. 771-777, 1991.

DUARTE, J. P., REDAELLI, L. R., SILVA, C. E., JAHNKE, S. M. Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on the Immune System of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Immatures. **Journal of Insect Science**, v. 20, n. 3, p. 17, 2020.

ER, A., TAŞKIRAN, D., SAK, O. Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Biological Sciences**, v. 69, n.2, p. 335-344, 2017.

FAVORETO, A. L., PAVANI, R. F., RIBEIRO, M. F., ZANUNCIO, A. J. V., SOARES, M. A., ZANUNCIO, J. C., WILCKEN, C. F. *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae): first report of parasitism in *Oxydia vesulia* (Lepidoptera: Geometridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 406-410, 2020.

GAI, M.N., ÁLVAREZ, C., VENEGAS, R., MORALES, J. An HPLC method for determination of azadirachtin residues in bovine muscle. **Journal of Chromatographic Science**, v.49, p. 327-331, 2011.

GOMES, I. N., VIEIRA, K. I. C., GONTIJO, L. M., RESENDE, H. C. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 97-107, 2020.

GONZÁLEZ, J. F. A.; MONTES DE OCA, F. N.; RAVELO, H. G. Bio-ecological studies of *Tetrastichus howardi* Olliff. (Hymenoptera: Eulophidae), pupal parasite of *Diatraea saccharalis* (Fabr) (Lepidoptera: Crambidae) in Cuba. **Centro Agrícola**, v. 30, n. 2, p. 37-41, 2003.

HARMANCI, C., BÜYÜKGÜZEL, K., BÜYÜKGÜZEL, E. The Effect of Neomycin on Survival and Development of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared on a natural host. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 3, p.1081-1088, 2019.

KFIR, R.; GOUWS, J., MOORE, S. D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): a facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 149-159, 1993.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review Entomology**, v. 43, p. 243-70, 1998.

KOVAŘÍKOVÁ, K., PAVELA, R. United forces of botanical oils: Efficacy of neem and karanja oil against colorado potato beetle under laboratory conditions. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 608, 2019.

KRELL, V., JAKOBS-SCHOENWANDT, D., VIDAL, S., PATEL, A.V. Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. **Biological Control**, 2018.

LA SALLE, J.; POLASZEK, A. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). **African Entomology**, v. 15, n. 1, p. 45-56, 2007.

LAMPIRI, E., AGRAFIOTI, P., LEVIZOU, E., ATHANASSIOU, C. G. Insecticidal effect of *Dittrichia viscosa* lyophilized epicuticular material against four major stored-product beetle species on wheat. **Crop Protection**, p. 105095, 2020.

LEACH, A. B., HOEPTING, C. A., NAULT, B. A. Grower adoption of insecticide resistance management practices increase with extension-based program. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 515-526, 2019.

LUNTZ, A.J.M.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.4, p.615-632, 2000.

MONSREAL-CEBALLOS, R. J., RUIZ-SÁNCHEZ, E., BALLINA-GÓMEZ, H. S., REYES-RAMÍREZ, A., GONZÁLEZ-MORENO, A. Effects of Botanical Insecticides on Hymenopteran Parasitoids: a Meta-analysis Approach. **Neotropical Entomology**, p. 1-8, 2018.

MOSSA, A. T. H.; MOHAFRASH, S. M. M; CHANDRASEKARAN, N. Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

NAPOLEÃO, T.H.; BELMONTE, B. do R.; PONTUAL, E.V.; DE ALBUQUERQUE, L.P.; SÁ, R.A.; PAIVA, L.M.; COELHO, L.C.B.; PAIVA, P.M.G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 26-33, 2013.

PARREIRA, D. S., ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R., ZANUNCIO, J. C., LEMES, P. G., DA SILVA ROLIM, G., BARBOSA, L. R., LEITE, G. L. D., SERRÃO, J. E. Essential oils cause detrimental effects on biological parameters of *Trichogramma galloi* immatures. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 887-895, 2018.

PASCOLI, M., DE ALBUQUERQUE, F. P., CALZAVARA, A. K., TINOCO-NUNES, B., OLIVEIRA, W. H. C., GONÇALVES, K. C., POLANCZYK, R. A.; VECHIA, J. F. D.; DE MATOS, S. T. S.; DE ANDRADE, D. J.; OLIVEIRA, H. C.; SOUZA-NETO, J. A.; DE LIMA, R.; OLIVEIRA, H. C. The potential of nanobiopesticide based on zein nanoparticles and neem oil for enhanced control of agricultural pests. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 2, p. 793-806, 2020.

PEREIRA, E. S., CALDEIRA, Z. V., SOARES, M. A. Manejo integrado de pragas na eucaliptocultura: inseticidas e parasitoides são compatíveis? **Agri-Environmental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-13, 2016.

PEREIRA, F. F., ZANUNCIO, T. V., ZANUNCIO, J. C., PRATISSOLI, D., TAVARES, M. T. Species of Lepidoptera defoliators of *Eucalyptus* as new host for the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 259-262, 2008.

PIÑEYRO, N. G., FAGUNDES PEREIRA, F., GOMES BORGES, F. L., ROSSONI, C., DE SOUZA SILVA, A., OLIVEIRA KASSAB, S. Does multiplying *Tetrastichus howardi*

(Hymenoptera: Eulophidae) in the silkworm affect its biology?. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 1, p. 189-193, 2016.

PRÜTZ, G., BRINK, A., DETTNER, K. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: effects of *Bacillus thuringiensis*-corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 9, p. 451-454, 2004.

RODRIGUES, A., PEREIRA, F. F., BARBOSA, P. R., SILVA-TORRES, C. S., TORRES, J. B. Parasitism behavior of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on larvae and pupae of sugarcane borers. **Journal of Insect Behavior**, v. 34, n. 3, p. 71-81, 2021.

SHARMA, S., AGGARWAL, N. Safety assessment of selected biopesticides and botanicals on *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in fields. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 57, n. 6, p. 443-449, 2019.

SILVA-TORRES, C. S. A., PONTES, I. V. A. F., TORRES, J. B., BARROS, R. New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 835-838, 2010.

SIMONATO, J., DE OLIVEIRA, H. N., GRIGOLLI, J. F., GRIGOLLI, M. M. K., DA SILVA, I. F. Potential of the parasitoid *Tetrastichus howardi* (Olliff, 1893) (Hymenoptera: Eulophidae) on the control of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural Science**, 2020.

SOARES, M.A., GUTIERREZ, C.T., ZANUNCIO, J.C., PEDROSA, A.R.P., LORENZON, A.S. Superparasitismo de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) y comportamiento de defensa de dos hospederos. **Revista Colombiana de Entomología** V. 35, p. 62–65, 2009.

SULLIVAN, D. J., VÖLKL, W. Hyperparasitism: multitrophic ecology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 291-315, 1999.

TIAN, P., LIU, D., LIU, Z., SHI, J., HE, W., QI, P., CHEN, J., SONG, B. Design, synthesis, and insecticidal activity evaluation of novel 4-(N, N-diarylmethylamines) furan-2 (5H)-one derivatives as potential acetylcholine receptor insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 427-437, 2019.

ZANUNCIO, J. C., MOURÃO, S. A., MARTÍNEZ, L. C., WILCKEN, C. F., RAMALHO, F. S., PLATA-RUEDA, A., SOARES, M. A., SERRÃO, J. E. Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, v. 6, p. 30261, 2016.

ARTIGO CIENTÍFICO I

**TOXIDADE AGUDA DE ÓLEO DE NEEM E EFEITOS NA BIOLOGIA DE
Tetrastichus howardi (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

RESUMO

Inseticidas botânicos e parasitoides são táticas de controle que podem ser compatíveis em programas de manejo integrado de pragas. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade aguda provocada pelo óleo de neem sobre fêmeas adultas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) e os efeitos sobre sua biologia. O experimento foi conduzido em sala climatizada, no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. O inseticida utilizado foi o óleo de neem, produto comercial Sempre Verde Killer Neem[®], 3000 ppm de azadiractina (0,30%). Fêmeas recém-emergidas de *T. howardi* foram expostas às concentrações 0.0; 6.5; 7.5; 8.5; 9.5; 10.5; 11.5; 12.5 e 13.5 μmL^{-1} do óleo de neem para determinação da relação dose-resposta e estimativa das CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₉. Para avaliação do efeito do neem na biologia do parasitoide, fêmeas recém-emergidas de *T. howardi* foram expostas a água, CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem. As fêmeas sobreviventes foram acondicionadas em recipientes contendo pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) para parasitismo e avaliação da biologia de *T. howardi* (parasitismo, emergência, razão sexual, longevidade, período ovo-adulto, tamanho da cápsula cefálica, e comprimento da tibia posterior). As concentrações letais (CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₉) do óleo de neem foram estimadas em 7.35 $\mu\text{l mL}^{-1}$, 11.0 $\mu\text{l mL}^{-1}$, e 17.7 $\mu\text{l mL}^{-1}$, respectivamente. A porcentagem de mortalidade aumentou com o incremento das concentrações do óleo de neem. O parasitismo das fêmeas parentais e o número de indivíduos da geração F1 emergidos foi reduzido e o período ovo-adulto foi alongado pela CL₅₀ do neem. A razão sexual, longevidade, largura da cápsula cefálica, e comprimento da tibia posterior das fêmeas da geração F1 de *T. howardi* foram semelhantes nas diferentes concentrações de neem. O produto a base de neem estudado não apresentou risco de toxicidade aguda ao parasitoide *T. howardi*. Entretanto, reduziu o parasitismo e o número de indivíduos emergidos por hospedeiro, e prolongou o ciclo ovo-adulto, após uma exposição aguda. Assim, são necessárias estratégias para aplicações dessas duas táticas de controle no manejo integrado de pragas, de forma a não expor *T. howardi* às moléculas de azadiractina.

Palavras-chave: Azadiractina. Concentração letal. MIP. Parasitoide.

ABSTRACT

Botanical insecticides and parasitoids are control tactics that can be compatible in integrated pest management programs. The aim of this study was to evaluate the acute toxicity caused by neem oil on adult females of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) and the effects on their biology. The experiment was conducted in a climate-controlled room at the Laboratory of Biological Control of Insects at the Federal University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, Minas Gerais, Brazil. The insecticide used was neem oil, commercial product Semper Verde Killer Neem[®], 3000 ppm of azadirachtin (0.30%). Newly emerged females of *T. howardi* were exposed to concentrations 0.0; 6.5; 7.5; 8.5; 9.5; 10.5; 11.5; 12.5 and 13.5 $\mu\text{ mL}^{-1}$ of neem oil for determination of dose-response relationship and estimation of LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₉. To evaluate the effect of neem on the biology of the parasitoid, newly emerged females of *T. howardi* were exposed to water, LC₁₀ and LC₅₀ of neem oil. Surviving females were placed in containers containing pupae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) for parasitism and evaluation of *T. howardi* biology (parasitism, emergence, sex ratio, longevity, egg-to-adult period, head capsule size, and head length). Lethal concentrations (LC₁₀, LC₅₀, and LC₉₉) of neem oil were estimated to be 7.35 $\mu\text{ l mL}^{-1}$, 11.0 $\mu\text{ l mL}^{-1}$, and 17.7 $\mu\text{ l mL}^{-1}$, respectively. The percentage of mortality increased with increasing concentrations of neem oil. The parasitism of parental females and the number of individuals of the F1 generation emerged was reduced and the egg-adult period was lengthened by the LC₅₀ of neem. The sex ratio, longevity, width of the head capsule, and length of the posterior tibia of females of the F1 generation of *T. howardi* were similar in different neem concentrations. The studied neem-based product did not present a risk of acute toxicity to the *T. howardi* parasitoid. However, it reduced parasitism and the number of emerged individuals per host and prolonged the egg-adult cycle after acute exposure. Therefore, strategies are needed to apply these two control tactics in integrated pest management, so as not to expose *T. howardi* to azadirachtin molecules.

Keywords: Azadirachtin. Lethal concentration. MIP. Parasitoid.

1 INTRODUÇÃO

Inseticidas botânicos podem ser utilizados como alternativa aos inseticidas sintéticos, por provocarem menor impacto ambiental e risco para saúde humana (ALI et al., 2018, FRANCESENA; SCHNEIDER, 2018, SILVA et al., 2020). No entanto, assim como os inseticidas sintéticos, podem impactar inimigos naturais, que são organismos não alvos (MOSSA et al., 2018, PARREIRA et al., 2019, CALDEIRA et al., 2022). Por isso, avaliar a seletividade dos inseticidas botânicos a parasitoides e predadores é importante (DROBNJAKOVIĆ et al., 2018).

O óleo de neem é um inseticida botânico extraído da árvore de neem indiano (*Azadirachta indica*) (CAMPOS et al., 2016), que pode ser utilizado para o controle das mais diversas espécies de pragas, sendo a azadiractina o principal composto que confere o seu potencial inseticida (DUARTE et al., 2020).

Tetrastichus howardi Olliff (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide de insetos de origem asiática, que posteriormente foi introduzido na África do Sul, para o controle biológico de duas pragas importantes do milho e do sorgo, *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) e *Busseola fusca* Fuller (Lepidoptera: Noctuidae) (DE OLIVEIRA et al., 2016; TANG et al., 2021). Esse endoparasitoide é também considerado, em alguns casos, hiperparasitoide facultativo (SULLIVAN; VÖLKL, 1999), e tem como hospedeiros pupas de lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros (KFIR; GOUWS; MOORE, 1993, PRÜTZ; BRINK; DETTNER, 2004). No Brasil, *T. howardi* teve introdução natural e foi registrado e é comercializado para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) e *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) (AGROFIT, 2023). *Tetrastichus howardi* é um dos inimigos naturais que pode ser exposto a formulados comerciais à base de óleo de neem, em programas de manejo integrado de pragas.

Compreender os efeitos subletais de doses/concentrações de inseticidas a artrópodes benéficos é importante para a manutenção desses insetos no campo. Uma vez que, as moléculas de produtos químicos podem causar efeitos letais, como a morte imediata do organismo ou efeitos subletais, em sua biologia, fisiologia ou comportamento, se esses sobreviverem após uma exposição aguda ao inseticida (DESNEUX et al., 2007; RICUPERO et al., 2020).

O objetivo desse estudo foi determinar a toxicidade aguda provocada pelo óleo de neem em fêmeas adultas de *T. howardi* e os efeitos sobre sua biologia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em sala climatizada com temperatura variando entre $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h, no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

2.1 Inseticida

Foi utilizado o óleo de neem, produto formulado comercial Sempre Verde Killer Neem[®], 3000 ppm de azadiractina (0,30%), inseticida natural de amplo espectro de ação (Bonigo Indústria e Comércio LTDA) e água como testemunha.

2.2 Insetos (parasitoide e hospedeiro)

O parasitoide *Tetrastichus howardi* e o hospedeiro *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) foram obtidos das criações mantidas no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFVJM.

Os parasitoides foram criados em potes plásticos de 500 mL, onde foi fornecido mel para alimentação dos adultos. As pupas do hospedeiro alternativo *T. molitor*, com menos de 24 h de idade, foram expostas ao parasitismo para permitir o desenvolvimento dos imaturos até a emergência de novos indivíduos adultos do parasitoide. O hospedeiro *T. molitor* foi criado em bandejas plásticas contendo farelo de trigo e colmos de cana-de-açúcar.

2.3 Toxicidade aguda ao óleo de neem

Fêmeas adultas de *T. howardi* com menos de 48h de emergência foram separadas e alimentadas com mel 24h antes da exposição ao óleo de neem. Em seguida, alíquotas de 100 μl das soluções com as concentrações 0.0; 6.5; 7.5; 8.5; 9.5; 10.5; 11.5; 12.5 e 13.5 $\mu\text{l mL}^{-1}$ de neem foram pipetadas e espalhadas dentro de frascos de vidro tipo penicilina de 13 mL (58 mm de altura e 27 mm de diâmetro) (Glasslab, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após 24h, com a secagem completa da água, dez parasitoides fêmeas foram colocados no frasco correspondente a cada concentração, onde permaneceram por 24h. Em alguns pré-testes, foi observado que os parasitoides subiam para a região superior do frasco, onde estava a tampa que não continha óleo de neem. Para evitar que os parasitoides chegassem até a tampa foi passado talco neutro na borda dos frascos, assim eles perdiam a aderência e não conseguiam ultrapassar esse limite. Indivíduos mortos e vivos foram contados

após a exposição por 24h para determinar a relação dose-resposta e estimar a CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₉ do óleo de neem para *T. howardi* (VON SANTOS VELOSO et al., 2013). Indivíduos que permaneceram imóveis quando manipulados foram considerados mortos. Aqueles que se movimentaram foram considerados vivos. O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos (concentrações de inseticidas) e seis repetições. Cada repetição foi composta por um frasco de vidro contendo a concentração de inseticida e dez fêmeas adultas de *T. howardi*.

2.4 Toxicidade da CL₁₀ e CL₅₀ na biologia de *T. howardi* após exposição aguda

Fêmeas adultas de *T. howardi* com menos de 48h de emergência foram separadas e alimentadas com mel 24h antes da exposição ao óleo de neem. Em seguida, alíquotas de 100 µl de água, CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem foram pipetadas e espalhadas dentro de frascos de vidro tipo penicilina de 13 mL (58 mm de altura e 27 mm de diâmetro) (Glasslab, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após 24h, com a secagem completa da água, vinte parasitoides fêmeas foram colocados no frasco correspondente a cada concentração, onde permaneceram por 24h. Após esse período, seis fêmeas sobreviventes foram transferidas para tubos de ensaio (18 x 180 mm), contendo mel para alimentação e uma pupa de *T. molitor* com menos de 24h de idade, para parasitismo. Os tubos foram vedados com um chumaço de algodão, e acondicionados em sala com as condições controladas, por 48h. As pupas foram transferidas para postes plásticos de 250 mL até a emergência do parasitoide.

Parasitismo (%), número de indivíduos emergidos, razão sexual, longevidade (dias), período ovo-adulto (dias), tamanho da capsula cefálica (mm), e comprimento da tibia posterior (mm), foram avaliados. O parasitismo foi determinado a partir da mudança de coloração das pupas, sendo aquelas com coloração amarronzada, consideradas parasitadas. Emergência e razão sexual foram obtidas pela contagem do número de fêmeas e machos emergidos por pupa de *T. molitor*. A longevidade foi obtida, pela mortalidade diária das fêmeas. O período ovo-adulto foi obtido pelo intervalo entre a data de parasitismo e emergência da nova geração do parasitoide. A morfometria (largura da cápsula cefálica na altura mediana dos olhos e o comprimento da tibia posterior) foi obtida de uma fêmea por repetição, escolhida ao acaso. As medições foram realizadas a partir de fotografias adquiridas com o auxílio de uma câmera Optika OPTIKAM B5 acoplada a um microscópio estereoscópico, utilizando o software Optika Vision Lite 2.1.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três concentrações e 12 repetições.

2.5 Análise estatística

A relação dose-resposta e a estimativa das CL_{10} , CL_{50} e CL_{99} foram obtidas a partir do modelo logaritmo logístico. Os dados de parasitismo foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Os demais dados foram submetidos aos pressupostos da análise paramétrica (independência dos erros, normalidade e homogeneidade de variâncias). Número de indivíduos emergidos, tamanho da capsula cefálica e comprimento da tibia posterior atenderam aos pressupostos e foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. Longevidade, período ovo-adulto, e razão sexual não atenderam aos pressupostos da análise paramétrica e foram transformados por Box-Cox. Mesmo após a transformação os dados de período ovo-adulto e razão sexual não atenderam aos pressupostos e foram submetidos à análise não paramétrica, teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Os dados de longevidade atenderam aos pressupostos após a transformação e foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas no software R (BOX; COX, 1964, MENEZES et al., 2014, HELPS; PAVELEY; BOSCH, 2017).

3 RESULTADOS

As CL_{10} , CL_{50} e CL_{99} de óleo de neem da população de *T. howardi* foram 7.35, 11.0, e 17.7 $\mu\text{l mL}^{-1}$ respectivamente. A porcentagem de mortalidade de *T. howardi* aumentou com as concentrações do óleo de neem (Gráfico 1).

O parasitismo por fêmeas parentais de *T. howardi* foi reduzido pela CL_{50} do óleo de neem em relação ao controle ($X^2 = 9.479$; GL = 2; $P = 0.009$; Tabela 1).

O número de indivíduos de *T. howardi* emergidos por pupa de *T. molitor* foi menor com a CL_{50} do óleo de neem do que com o controle e com a CL_{10} ($F = 4.5$; GL = 2, 21; $P = 0.0236$; Tabela 2).

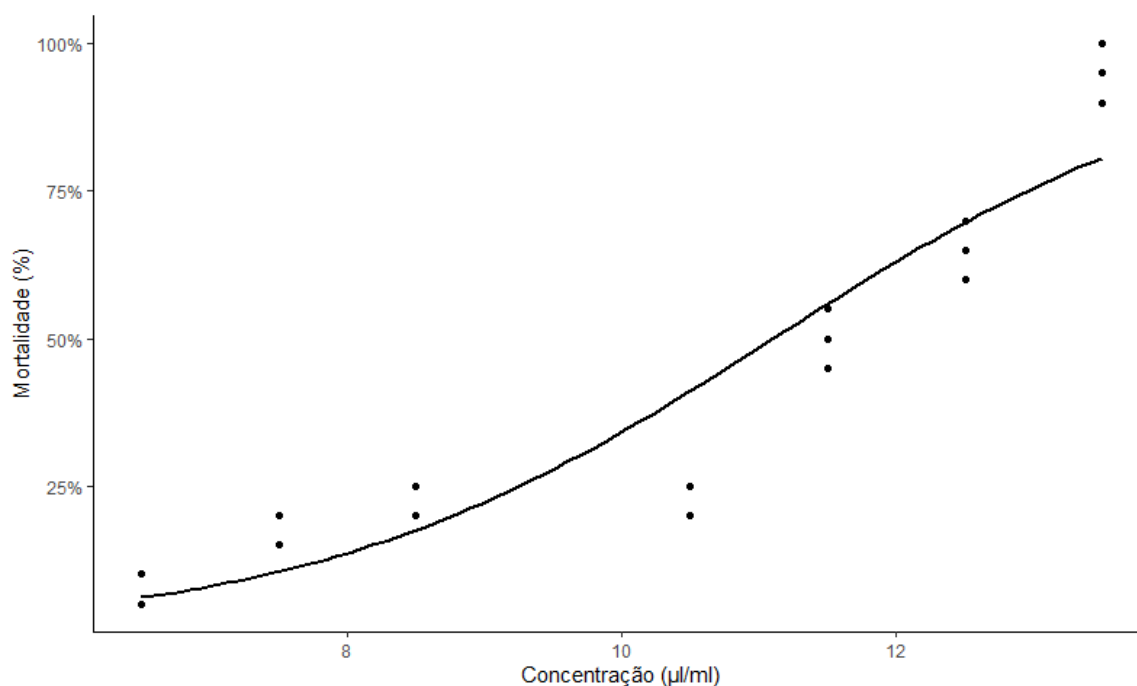
A razão sexual de *T. howardi* foi superior a 80%, não diferindo entre as concentrações ($F = 1.91$; GL = 2, 21; $P = 0.1728$; Tabela 2).

A longevidade das fêmeas de *T. howardi* foi acima de 15 dias, não diferindo entre as concentrações ($F = 2.96$; GL = 2, 19; $P = 0.0758$; Tabela 2).

O período ovo-adulto de *T. howardi* foi mais longo na CL_{50} do que no controle e CL_{10} ($\chi^2 = 9.75$; GL = 2; $P = 0.0076$; Tabela 2).

A largura da cápsula cefálica ($F= 3.12$; $GL = 2, 18$; $P = 0.0685$) e comprimento da tibia posterior ($F= 0.13$; $GL = 2, 21$; $P = 0.8758$) de *T. howardi* não diferiu entre as concentrações (Tabela 2).

Gráfico 1 - Curva dose-resposta para a toxicidade aguda do óleo de neem (*Azadirachta indica*) em fêmeas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) após 24h de exposição a diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1 – Porcentagem de parasitismo da geração parental de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), após exposição aguda por 24h à água e às concentrações letais (CL₁₀ e CL₅₀) do óleo de neem (*Azadirachta indica*)

Concentração (µl mL ⁻¹)	Parasitismo (%)
0.00	91.67 a
7.35	75.00 ab
11.0	33.33 b

Fonte: Elaborada pelo autor.

Porcentagens seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo Teste de Kruskal Wallis ($P < 0.05$).

Tabela 2 – Número de indivíduos emergidos (Emer.), razão sexual (RS), longevidade (Lon.), período ovo-adulto (Per.), comprimento da capsula cefálica (CC) e da tibia posterior (TP) da geração F1 de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae), após exposição aguda das

fêmeas parentais à água e às concentrações letais (CL₁₀ e CL₅₀) do óleo de neem (*Azadirachta indica*)

Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	Emer.**	RS**	Lon.**	Per.*	CC**	TP*
0.00	132 ±	0.95 ±	16 ±	19 ±	0.54 ±	0.52 ±
	15.36a	0.00a	2.31a	0.34b	0.00a	0.01a
7.35	133 ±	0.96 ±	24 ±	18 ±	0.51 ±	0.52 ±
	16.98a	0.00a	2.58a	0.24b	0.01a	0.01a
11.0	49 ±	0.98 ±	24 ±	21 ±	0.55 ±	0.53 ±
	25.47b	0.01a	3.65a	0.71a	0.01a	0.02a

Fonte: Elaborada pelo autor.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo Teste Tukey** ou Kruskal Wallis* ($P < 0.05$).

4 DISCUSSÃO

As CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₉ do óleo de neem da população de *T. howardi* demonstra resistência do parasitoide ao neem em exposição aguda. Pois, apenas a CL₉₉ está acima da concentração recomendada pelo fabricante, de 15 $\mu\text{l mL}^{-1}$, para o controle de pulgões, cochonilhas, tripes, mosca-branca e ácaros (Bonigo Indústria e Comércio LTDA, Campo Limpo Paulista, São Paulo, Brasil). Além disso, a CL₅₀ do neem para *T. howardi* é quase três vezes maior do que a estimada para o parasitoide de pupas, *Palmistichus elaeisis* Delvare e Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae) (CALDEIRA et al., 2022). A toxicidade dos produtos químicos depende das condições de laboratório, da espécie em estudo, do produto comercial utilizado, bem como o lote de fabricação, e da quantidade de outros metabólitos secundários presentes no óleo (RASHIDI et al., 2018).

A redução do parasitismo por fêmeas parentais de *T. howardi* pela CL₅₀ do óleo de neem, pode se dever à alteração que os inseticidas a base de neem provocam no desenvolvimento e reprodução, suprimindo a fertilidade e até mesmo esterilizando os insetos (CAMPOS et al., 2016; FRANCESENA; SCHNEIDER, 2018). Semelhante ao relatado para o parasitoide *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae), que teve o parasitismo reduzido, quando exposto a 20 mg i.a.L⁻¹ de azadiractina (FRANCESENA; SCHNEIDER, 2018). Isso prejudica a ação do parasitoide, uma vez que precisam parasitar para parar o desenvolvimento da praga e manter a sua população, gerando novos descendentes.

O menor número de indivíduos de *T. howardi* da geração F1 emergidos por pupa de *T. molitor*, com a CL₅₀ do óleo de neem, também está relacionado com o efeito do neem na

reprodução dos insetos. Pois, além do inseticida bloquear a oviposição, provavelmente deixando fêmeas estéreis, pode ainda reduzir a quantidade de ovos depositados no interior do hospedeiro (CAMPOS et al., 2016), reduzindo, conseqüentemente, o número de parasitoides emergidos. Isto pode diminuir a população de *T. howardi*, que pode não conseguir se reestabelecer nas gerações seguintes, deixando de existir no local e de desempenhar o controle biológico.

A razão sexual de *T. howardi* acima de 80% é característica dessa espécie de parasitoide (TIAGO et al., 2019). Esse resultado foi semelhante ao observado para o parasitoide *P. elaeisis* exposto a quatro concentrações do mesmo produto utilizado neste trabalho, que permaneceu com a razão sexual acima de 80% (CALDEIRA et al., 2022). Nos endoparasitoides, a predominância de fêmeas em relação a machos é importante, pois são elas as responsáveis pelas gerações subsequentes, e por impedir a continuidade do ciclo de vida da praga (TIAGO et al., 2019; PEREIRA et al., 2009; CALDEIRA et al., 2022). Isso representa ausência de impactos do neem sobre esse parâmetro, e ainda que a população de *T. howardi* pode se recuperar, nas próximas gerações, pois, alcançaram um número satisfatório de fêmeas, mesmo com o número reduzido de indivíduos emergidos.

A longevidade de *T. howardi* acima de 15 dias, semelhante entre as concentrações, demonstra ausência de impactos do neem sobre esse parâmetro. Este resultado foi diferente do encontrado para *E. mundus*, que teve a longevidade reduzida quando exposto a 20 mg i.a.L⁻¹ de Azadiractina (FRANCESENA; SCHNEIDER, 2018). É interessante que as fêmeas vivam mais, pois terão mais tempo de busca por hospedeiros (PEREIRA et al., 2010; CALDEIRA et al., 2022), e assim possam desempenhar o controle biológico de pragas em sistemas cultivados.

O longo período ovo-adulto provocado pela CL₅₀ do óleo de neem a *T. howardi*, pode estar relacionado ao efeito da Azadiractina no sistema endócrino dos insetos, alterando o equilíbrio do hormônio juvenil, retardando a mudança de instares (SIEGWART et al., 2015; CALDEIRA et al., 2022). Semelhante ao observado para o período ovo-adulto do endoparasitoide *P. elaeisis*, alongado na geração F1, quando submetidos a tratamentos contendo o mesmo produto deste trabalho (CALDEIRA et al., 2022). Os adultos são os responsáveis pelo controle das pragas. Portanto, é prejudicial para os endoparasitoides o alongamento no período ovo-adulto, que corresponde a demorar mais tempo para atingir a fase adulta, obtendo menor número de gerações por período.

A semelhança entre as concentrações de neem para a largura da cápsula cefálica e comprimento da tibia posterior de *T. howardi* indica manutenção desses parâmetros em meios

contaminados, nas gerações subsequentes. O tamanho do parasitoide e o seu desempenho de busca pelo hospedeiro no campo e a sua capacidade de acasalamento se relacionam positivamente (PEREIRA COSTA et al., 2020; SOUZA et al., 2018). Assim, *T. howardi*, pôde manter a morfometria característica da espécie após a contaminação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A azadiractina não apresenta risco de toxicidade aguda ao parasitoide *T. howardi*. Por outro lado, afeta parâmetros biológicos do inseto após exposição aguda, tais como redução no parasitismo e no número de indivíduos emergidos por hospedeiro, e prolongamento do ciclo ovo-adulto. Esses impactos podem prejudicar o desempenho e a manutenção de populações do parasitoide no campo, sendo necessário algumas estratégias na utilização conjunta dessas duas táticas de controle no manejo integrado de pragas, de forma que *T. howardi* não seja exposto diretamente ao óleo de neem, como fazer a liberação do endoparasitoide em períodos alternados aos da pulverização do inseticida.

REFERÊNCIAS

AGROFIT consulta aberta. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2023. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 30 de maio de 2023.

ALI, S., FAROOQI, M. A., SAJJAD, A., ULLAH, M. I., QURESHI, A. K., SIDDIQUE, B., WAHEED, W., SARFRAZ, M., ASGHAR, A. Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid, *Sitobion avenae* (Fab.) (Hemiptera: Aphididae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2018.

BOX, GEORGE EP; COX, DAVID R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 26, n. 2, p. 211-243, 1964.

CALDEIRA, Z.V., SOARES, M.A., VELOSO, R, V.S., SILVA, C.S., COSTA, E.S.P., SANTOS, M.M., SILVA, I.M., SILVA, W.M., ZANUNCIO, J.C. Acute and chronic toxicity of neem oil to the endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 5, p. 1545-1550, 2022.

CAMPOS, E. V., DE OLIVEIRA, J. L., PASCOLI, M., DE LIMA, R., FRACETO, L. F. Neem oil and crop protection: from now to the future. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1494, 2016.

MENEZES, C. W., SOARES, M. A., FONSECA, A. J., DOS SANTOS, J. B., CAMILO, S. D. S., ZANUNCIO, J. C. *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) as an indicator of toxicity of herbicides registered for corn in Brazil. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 3, p. 361-365, 2014.

DE OLIVEIRA, H. N., SIMONATO, J., GLAESER, D. F., PEREIRA, F. F. Parasitism of *Helicoverpa armigera* pupae (Lepidoptera: Noctuidae) by *Tetrastichus howardi* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 111-115, 2016.

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.

DROBNJAKOVIĆ, T., MARČIĆ, D., PRIJOVIĆ, M., PERIĆ, P., MILENKOVIĆ, S., BOŠKOVIĆ, J. Sublethal effects of NeemAzal-T/S botanical insecticide on Dutch and Serbian populations of *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 1-19, 2018.

DUARTE, J. P., REDAELLI, L. R., SILVA, C. E., JAHNKE, S. M. Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on the Immune System of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Immatures. **Journal of Insect Science**, v. 20, n. 3, p. 17, 2020.

FRANCESENA, N., SCHNEIDER, M. I. Selectivity assessment of two biorational insecticides, azadirachtin and pyriproxyfen, in comparison to a neonicotinoid, acetamiprid, on pupae and adults of a Neotropical strain *Eretmocerus mundus* Mercet. **Chemosphere**, v. 206, p. 349-358, 2018.

HELPS, J. C., PAVELEY, N. D., BOSCH, F. V. D. Identifying circumstances under which high insecticide dose increases or decreases resistance selection. **Journal of Theoretical Biology**, v. 428, p. 153-167, 2017.

KFIR, R., GOUWS, J., MOORE, S. D. *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): a facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 149-159, 1993.

LIMA, A.P.S., SANTANA, E.D.R., SANTOS, A.C.C., SILVA, J.E., RIBEIRO, G.T., PINHEIRO, A.M., SANTOS, I.T.B.F., BLANK, A.F., ARAÚJO, A.P.A., BACCI, L. Insecticide activity of botanical compounds against *Spodoptera frugiperda* and selectivity to the predatory bug *Podisus nigrispinus*. **Crop Protection**, v. 136, p. 105230, 2020.

MOSSA, A. T. H., MOHAFRASH, S. M. M., CHANDRASEKARAN, N. Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

PARREIRA, D.S., ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R., DIMATÉ, F.A.R., BATISTA, L.D., RIBEIRO, R.C., FERREIRA, G.A.R., ZANUNCIO, J.C. Bioactivity of ten essential oils on the biological parameters of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) adults. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 11-15, 2019.

PEREIRA COSTA, E. S., SOARES, M. A., CALDEIRA, Z. V., VON DOS SANTOS VELOSO, R., DA SILVA, L. A., DA SILVA, D. J. H., SANTOS, I. C. DE L., CASTRO, B. M. DE C., ZANUNCIO, J. C., LEGASPI, J. C. Selectivity of deltamethrin doses on *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2020.

PEREIRA, F. F., ZANUNCIO, J. C., SERRÃO, J. E., OLIVEIRA, H. N., FÁVERO, K., GRANCE, E. L. Progenie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 660-664, 2009.

PEREIRA, F. F., ZANUNCIO, J. C., SERRÃO, J. E., ZANUNCIO, T. V., PRATISSOLI, D., PASTORI, P. L. The density of females of *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) affects their reproductive performance on pupae of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 323-331, 2010.

PRÜTZ, G., BRINK, A., DETTNER, K. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: effects of *Bacillus thuringiensis*-corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 451-454, 2004.

RASHIDI, F., NOURI-GANBALANI, G., IMANI, S. Sublethal effects of some insecticides on functional response of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) when reared on two lepidopteran hosts. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 3, p. 1104-1111, 2018.

RICUPERO, M., DESNEUX, N., ZAPPALÀ, L., BIONDI, A. Target and non-target impact of systemic insecticides on a polyphagous aphid pest and its parasitoid. **Chemosphere**, v. 247, p. 125728, 2020.

SIEGWART, M., GRAILLOT, B., BLACHERE LOPEZ, C., BESSE, S., BARDIN, M., NICOT, P. C., LOPEZ-FERBER, M. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 381, 2015.

SILVA, I. M., SOARES, M. A., TAVARES, W. S., SANTOS, A., SERRÃO, J. E., ZANUNCIO, A. J. V., WILCKEN, C. F., ZANUNCIO, J. C., SEDIYAMA, S. Toxicity of essential oils to *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) and selectivity to its parasitoid *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 5, p. 2399-2406, 2020.

SOUZA, D., MONTEIRO, A. B., FARIA, L. DEL B. Morphometry, allometry, and fluctuating asymmetry of egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* under insecticide influence. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 4, p. 298-303, 2018.

SULLIVAN, D. J., VÖLKL, W. Hyperparasitism: multitrophic ecology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 291-315, 1999.

TANG, X., LYU, B., LU, H., TANG, J., MENG, R., CAI, B. Characterization of the mitochondrial genome of *Tetrastichus howardi* (Olliff 1893) (Hymenoptera: Eulophidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 6, n. 9, p. 2683-2685, 2021.

TIAGO, E. F., PEREIRA, F. F., KASSAB, S. O., BARBOSA, R. H., CARDOSO, C. R. G., SANOMIA, W. Y., HELTER, C. P., ROSILDA, M. M. F. S., ZANUNCIO, J. C. Biological quality of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) reared with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae after cold storage. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 3, p. 571-576, 2019.

VON SANTOS VELOSO, R., PEREIRA, E. J. G., GUEDES, R. N. C., & OLIVEIRA, M. G. A. Does cypermethrin affect enzyme activity, respiration rate and walking behavior of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*)? **Insect science**, v. 20, n. 3, p. 358-366, 2013.

ARTIGO CIENTÍFICO II

**REPELÊNCIA E EFEITOS SUBLETAIS DO ÓLEO DE NEEM AO PARASITOIDE
Tetrastichus howardi (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

RESUMO

O parasitoide *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae), é um dos inimigos naturais que pode ser exposto a inseticidas como o óleo de neem, o que torna importante o conhecimento sobre a sua seletividade a esse organismo benéfico. O objetivo foi avaliar a repelência e os efeitos subletais provocados pelo óleo de neem em fêmeas adultas de *T. howardi*. O experimento foi conduzido em sala climatizada, no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. O inseticida utilizado foi o óleo de neem, produto comercial Sempre Verde Killer Neem[®], 3000 ppm de azadiractina (0,30%). Para avaliação da repelência do óleo de neem a *T. howardi*, foi feito um teste de preferência com fêmeas do parasitoide por local contaminado ou não com a CL₅₀ (11.0 µl mL⁻¹) do óleo. Para avaliação dos efeitos subletais do óleo de neem a *T. howardi*, fêmeas do parasitoide foram acondicionadas a parasitar pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) contaminadas com água, CL₁₀ (7.35 µl mL⁻¹) ou CL₅₀ (11.0 µl mL⁻¹) do óleo de neem, de forma multi (grupo I) e transgeracional (grupo II). No grupo I as gerações parental, F1, F2 e F3 tiveram contato com pupas de *T. molitor* contaminadas pelo neem, no grupo II apenas a geração parental teve contato com pupas contaminadas. O índice de parasitismo, longevidade, emergência, razão sexual, período ovo-adulto, e morfometria de todas as gerações de *T. howardi* foram avaliados. *Tetrastichus howardi* teve preferência por local não contaminado pela CL₅₀, comprovando a repelência da azadiractina a esse parasitoide. Tanto na exposição transgeracional quanto na multigeracional o neem causou efeitos subletais a *T. howardi*, sendo mais prejudicial na exposição multigeracional. Portanto, a utilização desse produto a base de neem deve ser evitada em conjunto com liberações do parasitoide *T. howardi*, além de aplicações sucessivas do neem, em curtos intervalos, em um mesmo local em que ocorra a presença desse parasitoide.

Palavras-chave: Azadiractina. Exposição multi e transgeracional. Parasitoide. Seletividade.

ABSTRACT

The parasitoid *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) is one of the natural enemies that can be exposed to insecticides such as neem oil, which makes knowledge about its selectivity to this beneficial organism important. The objective was to evaluate the repellency and the sublethal effects caused by neem oil in adult females of *T. howardi*. The experiment was conducted in a climate-controlled room at the Laboratory of Biological Control of Insects at the Federal University of Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, Minas Gerais, Brazil. The insecticide used was neem oil, commercial product Semper Verde Killer Neem[®], 3000 ppm of azadirachtin (0.30%). To evaluate the repellency of neem oil to *T. howardi*, a preference test was carried out with females of the parasitoid per location contaminated or not with the LC₅₀ (11.0 µl mL⁻¹) of the oil. To evaluate the sublethal effects of neem oil on *T. howardi*, parasitoid females were conditioned to parasitize pupae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) contaminated with water, LC₁₀ (7.35 µl mL⁻¹) or LC₅₀ (11.0 µl mL⁻¹) of neem oil, in a multi (group I) and transgenerational (group II) way. In group I the parental generations, F1, F2 and F3 had contact with pupae of *T. molitor* contaminated by neem, in group II only the parental generation had contact with contaminated pupae. The parasitism index, longevity, emergence, sex ratio, egg-to-adult period, and morphometry of all generations of *T. howardi* were evaluated. *Tetrastichus howardi* preferred a site not contaminated by LC₅₀, proving the repellency of azadirachtin to this parasitoid. Both in transgenerational and multigenerational exposure, neem caused sublethal effects on *T. howardi*, being more harmful in multigenerational exposure. Therefore, the use of this neem-based product should be avoided together with releases of the parasitoid *T. howardi*, in addition to successive applications of neem, at short intervals, in the same place where this parasitoid occurs.

Keywords: Azadirachtin. Multi and transgenerational exposure. Parasitoid. Selectivity.

1 INTRODUÇÃO

Em programas de manejo integrado de pragas (MIP), os métodos de controle podem ser utilizados simultaneamente ou em sequência (KOGAN, 1998). Quando os controles biológico e químico são associados, os inseticidas podem atingir além das pragas, os inimigos naturais, provocando efeitos letais e/ou subletais (COSTA et al., 2020; CALDEIRA et al., 2022).

Tetrastichus howardi Olliff (Hymenoptera: Eulophidae), é um dos inimigos naturais que pode ser exposto aos inseticidas. Esse organismo é um endoparasitoide gregário, que se desenvolve no interior de larvas e pupas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, podendo ser em algumas situações um hiperparasitoide facultativo (KFIR; GOUWS; MOORE, 1993; SULLIVAN; VÖLKL, 1999; PRÜTZ; BRINK; DETTNER, 2004). É uma espécie de origem asiática, que foi observado no Brasil, pela primeira vez, parasitando pupas de *Diatreia saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) em plantas de milho, em Sete Lagoas, Minas Gerais (CRUZ et al., 2011), e em plantas de cana-de-açúcar, em Grande Dourados, Mato Grosso do Sul (VARGAS et al., 2011). Atualmente é registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da *D. saccharalis* e *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) (AGROFIT, 2023).

O óleo de neem, obtido das sementes do neem indiano (*Azadirachta indica*), apesar de ser um inseticida botânico, pode impactar inimigos naturais, como *T. howardi* (CAMPOS et al., 2016; PARREIRA et al., 2018; CALDEIRA et al., 2022). O principal composto que confere seu potencial inseticida é a Azadiractina, que pode ter ação nos insetos de forma tópica ou por ingestão, provocando principalmente repelência, paralisia na alimentação e desbalanço hormonal no sistema endócrino (CAMPOS et al., 2016; DUARTE et al., 2020).

Os inimigos naturais podem ser alvo de sucessivas aplicações de inseticidas, o que torna importante os estudos ecotoxicológicos com a abordagem transgeracional, que simula uma aplicação na geração parental, que pode prejudicar as gerações subsequentes do inseto, e a abordagem multigeracional, que simula várias aplicações do inseticida em várias gerações do inseto (SZABÓ; SERES; BAKONYI, 2020).

O objetivo do estudo foi avaliar a repelência por meio de teste de preferência e efeitos subletais provocados pelo óleo de neem sobre fêmeas adultas de *T. howardi* por meio de exposições trans e multigeracional.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em sala climatizada com temperatura variando entre $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h, no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, Minas Gerais.

2.1 Inseticida

Foi utilizado o óleo de neem, produto comercial Sempre Verde Killer Neem[®], 3000 ppm de azadiractina (0,30%), inseticida natural de amplo espectro de ação (Bonigo Indústria e Comércio LTDA) e água como testemunha.

2.2 Insetos (parasitoide e hospedeiro)

Tetrastichus howardi e *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), foram obtidos das criações mantidas no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFVJM.

2.3 Repelência da CL₅₀ do óleo de neem a *T. howardi*

Placas de Petri (10 × 20mm) foram revestidas com papel filtro umedecidos, metade com 750 µl de água destilada e a outra metade com 750 µl da CL₅₀ (11.0 µl mL⁻¹) do óleo de neem estimada anteriormente. Logo após, cinco fêmeas de *T. howardi* foram acondicionadas no centro da placa contendo os dois tratamentos, e após 30 min foi avaliado o número de indivíduos presente em cada local, com ou sem o óleo de neem (SOARES et al., 2023).

2.4 Efeitos subletais da CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem a *T. howardi* em exposição multi e transgeracional

Foram utilizadas as LC₁₀ (7.35 µl mL⁻¹) e LC₅₀ (11.0 µl mL⁻¹) do óleo de neem, estimadas anteriormente.

Um total de seis fêmeas, recém-emergidas, de *T. howardi* foram sexadas e acondicionadas em cada tubo de ensaio de vidro (18 x 180 mm). A parte superior do tubo foi vedada com chumaco de algodão e no interior foi acrescido uma gotícula de mel para alimentação e uma pupa de *T. molitor* contaminada pela respectiva concentração, representando uma unidade amostral. Pupas de *T. molitor* com menos de 24h de idade, característica identificada pela coloração mais clara, foram imersas por cinco segundos (RAMPELOTTI-FERREIRA et al., 2017) em 20 mL de solução (quinze pupas em cada concentração), posteriormente colocadas em papel toalha para absorção do solvente. As pupas contaminadas foram expostas ao parasitismo das fêmeas de *T. howardi* durante 48h. Após este

período foram transferidas para potes plásticos de 250 mL para acompanhamento da emergência da geração F1.

Após essa etapa a população foi dividida em dois grupos (SZABÓ; SERES; BAKONYI, 2020). No grupo I (exposição multigeracional), seis fêmeas de cada repetição foram sexadas e transferidas para novos tubos de ensaio contendo uma gotícula de mel e uma pupa de *T. molitor* contaminado com a respectiva concentração de neem, para o parasitismo por 48h. No grupo II (exposição transgeracional), seis fêmeas de cada repetição foram sexadas e transferidas para novos tubos de ensaio contendo uma gotícula de mel e uma pupa de *T. molitor* sem contaminação para o parasitismo por 48h. Após o parasitismo, as pupas foram transferidas para potes plásticos de 250 mL para emergência das gerações F2. Essas foram sujeitas à tratamentos semelhantes aos da geração anterior, de acordo com o grupo. O mesmo foi feito para a geração F3 (Figura 1). Em todas as gerações e grupos as fêmeas permaneceram nos tubos de ensaio para avaliações.

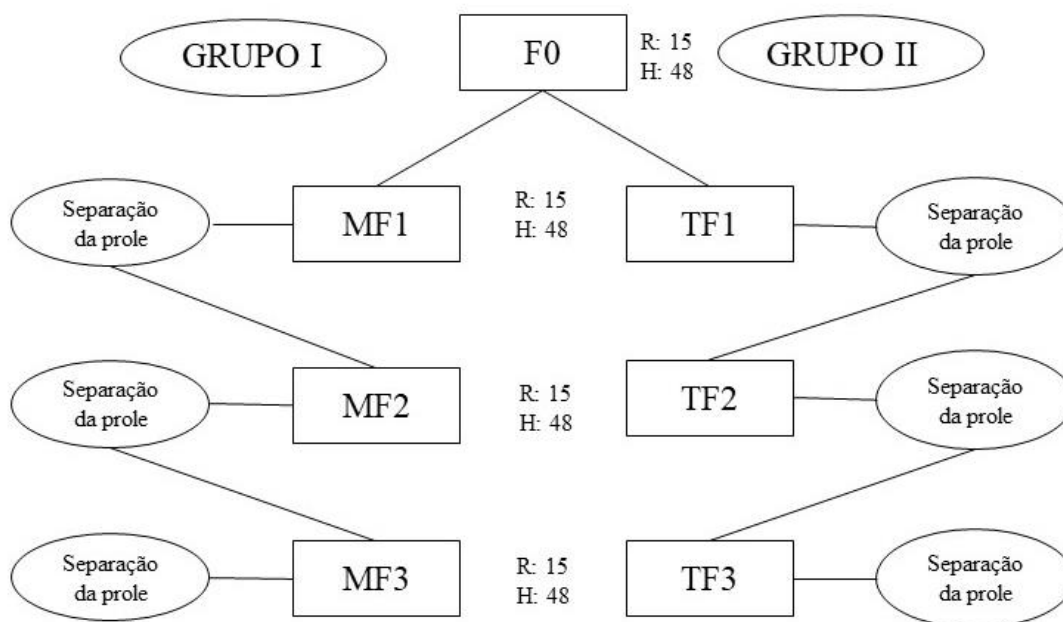
O parasitismo (%), longevidade (dias), emergência, razão sexual (RS= número de fêmeas emergidas/total de parasitoides emergidos), período ovo-adulto (dias), e comprimento da tíbia posterior em mm das gerações F0, F1, F2 e F3 foram avaliados. O parasitismo foi determinado a partir da mudança de coloração das pupas, sendo aquelas com coloração amarronzada, consideradas parasitadas. A longevidade foi obtida, pela mortalidade diária das fêmeas. Emergência e razão sexual foram obtidas pela contagem do número de fêmeas e machos emergidos por pupa de *T. molitor*. O período ovo-adulto foi obtido pelo intervalo entre a data de parasitismo e emergência da nova geração do parasitoide. O comprimento da tíbia posterior foi obtida de uma fêmea por repetição, escolhida ao acaso. As medições foram realizadas a partir de fotografias adquiridas com o auxílio de uma câmera Optika OPTIKAM B5 acoplada a um microscópio estereoscópico, utilizando o software Optika Vision Lite 2.1.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos e quinze repetições.

2.5 Análises estatísticas

Os dados de preferência de *T. howardi* por local contaminado ou não com o óleo de neem foram compilados na forma de frequências e analisados pelo teste qui-quadrado (PEARSON, 1904). Os dados de parasitismo foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância, e comparados pelo teste post hoc. Os demais dados foram submetidos aos pressupostos da análise paramétrica, submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas no software R (MENEZES et al., 2014, HELPS; PAVELEY; BOSCH, 2017).

Figura 1 - Design experimental. F0: geração parental, MF1: multigeracional, geração F1 tratada, TF1: transgeracional, geração F1 não tratada, MF2: multigeracional, geração F2, TF2: transgeracional, geração F2, MF3: multigeracional, geração F3, TF3: transgeracional geração F3.



Fonte: Elaborada pelo autor.

R: número de repetições, H: duração da exposição ao inseticida (horas).

3 RESULTADOS

A preferência de *T. howardi* foi pelos locais contendo água, evitando aqueles contendo a CL₅₀ do óleo de neem (Tabela 1).

Tabela 1 - Preferência de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) por local contaminado ou não pela CL₅₀ do óleo de neem

Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	Frequência	Porcentagem
0.00	61a	87.14
11.00	9b	12.85

Fonte: Elaborada pelo autor.

Frequências seguidas de letras diferentes na coluna, diferem pelo teste qui-quadrado a 1% de probabilidade.

O parasitismo por fêmeas de *T. howardi* foi reduzido pela CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem nas gerações parental ($X^2 = 25.143$; GL = 2; $P = 0.0000035$), MF1 ($X^2 = 5.72$; GL = 2;

$P = 0.05727$), MF2 ($X^2 = 6.2857$; GL = 2; $P = 0.04316$), MF3 ($X^2 = 2.0952$; GL = 2; $P = 0.3508$) e TF2 transgeracional ($X^2 = 28.247$; GL = 2; $P = 0.00000073$) (Tabela 2).

A longevidade das fêmeas de *T. howardi* foi semelhante entre as concentrações do óleo de neem e a água em todas as gerações (Tabela 2).

O número de indivíduos emergidos de *T. howardi* foi reduzido pela CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem nas gerações F1 (F= 23.41; GL = 2, 42; P = 0.00000015), MF3 (F= 45.32; GL = 2, 42; P = 3.253e⁻¹¹), e TF3 (F= 3.55; GL = 2, 42; P = 0.037) (Tabela 3).

O período ovo adulto de *T. howardi* foi semelhante entre as concentrações do óleo de neem e a água em todas as gerações (Tabela 3).

Tabela 2 - Parasitismo (%) (Par.) e longevidade (dias) (Lon.) das gerações parental, multigeracional F1 (MF1), multigeracional F2 (MF2), multigeracional F3 (MF3), transgeracional F1 (TF1), transgeracional F2 (TF2) e transgeracional F3 (TF3) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) expostas à água, CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem

Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	Parental		MF1		MF2		MF3	
	Par.*	Lon.**	Par.*	Lon.**	Par.*	Lon.**	Par.*	Lon.**
0.00	100a	33.47 \pm 3.26a	93.33a	16.80 \pm 1.03a	93.33a	23.60 \pm 1.16a	100a	26.07 \pm 2.55a
7.35	26.67b	40.67 \pm 4.80a	60ab	16.13 \pm 0.60a	26.67b	21.77 \pm 1.16a	6.67b	25.25 \pm 1.68a
11.00	20b	35 \pm 4.19a	46.67b	17.27 \pm 1.03a	0.00b	25.33 \pm 2.01a	-	-
Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	TF1		TF2		TF3			
	Par.*	Lon.**	Par.*	Lon.**	Par.*	Lon.**	Par.*	Lon.**
0.00	100a	15.15 \pm 0.31a	100a	24.5 \pm 2.96a	93.33a	25.87 \pm 1.54a		
7.35	93.33a	16.85 \pm 0.78a	86.67ab	23.8 \pm 1.31a	100a	23.38 \pm 1.30a		
11.00	73.33a	16.36 \pm 0.51a	66.67b	26.0 \pm 1.53a	86.67a	29 \pm 2.18a		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Porcentagens e médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo Teste de Kruskal Wallis* ou Tukey** (P < 0.05).

A razão sexual de *T. howardi* foi reduzida pela CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem nas gerações MF2 (F= 13.299; GL = 2, 28; P = 0.000087), MF3 (F= 10.724; GL = 1, 16; P = 0.004766), TF2 (F= 5.4297; GL = 2, 36; P = 0.008692) e TF3 (F= 3.5871; GL = 2, 34; P = 0.03859) (Tabela 4).

O comprimento da tibia posterior de *T. howardi* foi semelhante entre as concentrações do óleo de neem e a água em todas as gerações (Tabela 4).

Tabela 3 - Número de indivíduos emergidos (nº emergidos) e período ovo-adulto das gerações F1, multigeracional F2 (MF2), multigeracional F3 (MF3), transgeracional F1 (TF1), transgeracional F2 (TF2) e transgeracional F3 (TF3) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) expostas à água, CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem

Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	F1		MF2		MF3	
	Nº emergidos	Período ovo-adulto	Nº emergidos	Período ovo-adulto	Nº emergidos	Período ovo-adulto
0.00	72 ±	24.20 ±	75.33 ±	19.93 ±	129.20 ±	18.93 ±
	10.56a	0.48a	12.72a	0.52a	15.05a	1.37a
7.35	14 ±	23.13 ±	53.27 ±	21.78 ±	20.27 ±	22.75 ±
	7.21b	0.31a	17.57a	0.64a	9.65b	1.03a
11.00	4.53 ±	24.18 ±	26.26 ±	21.14 ±	0.00 ±	-
	2.74b	0.30a	10.14a	0.96a	0.00b	-
Concentrações ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	TF2		TF3			
	Nº emergidos	Período ovo-adulto	Nº emergidos	Período ovo-adulto		
0.00	105.87 ± 13.25a	19.86 ± 0.33a	126.00 ± 11.19a	20.53 ± 0.26a		
7.35	113.07 ± 14.07a	20.86 ± 0.43a	97.13 ± 17.19ab	20.46 ± 0.39a		
11.00	129.40 ± 26.58a	19.54 ± 0.36a	66.40 ± 18.16b	20.89 ± 0.65a		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo Teste Tukey ($P < 0.05$).

Tabela 4 - Razão sexual e comprimento da tibia posterior das gerações F1, multigeracional F2 (MF2), multigeracional F3 (MF3), transgeracional F1 (TF1), transgeracional F2 (TF2) e transgeracional F3 (TF3) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) expostas à água, CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem

Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	F1		MF2		MF3	
	Razão sexual	Tibia posterior	Razão sexual	Tibia posterior	Razão sexual	Tibia posterior
0.00	0.94 ±	0.56 ±	0.91 ±	0.52 ±	0.91 ±	0.50 ±
	0.01a	0.01a	0.01a	0.02a	0.01a	0.01a
7.35	0.93 ±	0.50 ±	0.82 ±	0.51 ±	0.5 ±	0.55 ±
	0.03a	0.02a	0.10a	0.02a	0.26b	0.01a
11.00	0.96 ±	0.53 ±	0.28 ±	0.51 ±	-	-
	0.06a	0.03a	0.17b	0.02a	-	-
Concentração ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	TF2		TF3			
	Razão sexual	Tibia posterior	Razão sexual	Tibia posterior		
0.00	0.94 ± 0.01a	0.49 ± 0.01a	0.95 ± 0.01a	0.52 ± 0.02a		
7.35	0.94 ± 0.01a	0.50 ± 0.01a	0.92 ± 0.01ab	0.52 ± 0.01a		
11.00	0.67 ± 0.13b	0.48 ± 0.02a	0.91 ± 0.02b	0.52 ± 0.02a		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem pelo Teste Tukey ($P < 0.05$).

4 DISCUSSÃO

A preferência de *T. howardi* por local não contaminado pelo óleo de neem, confirma a ação da azadiractina de repelência para esse parasitoide. *Ageniaspis citricola* também foi repelido pela azadiractina em um teste de olfatômetro contendo o extrato aquoso e o óleo das sementes de neem (CAÑARTE-BERMÚDEZ et al., 2020). O efeito de repelência pode ser positivo para os parasitoides, pois evita que eles tenham contato com superfície ou hospedeiro contaminado, diminuindo os riscos toxicológicos do inseticida para a população. À medida que pode também ser negativo, pois evita que o parasitoide se aproxime do hospedeiro contaminado, o que pode reduzir seu parasitismo e consequentemente o seu nível populacional.

A redução no parasitismo por fêmeas das gerações parental, MF1, MF2 e MF3 de *T. howardi* pela CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem, possivelmente se deve ao efeito de repelência desse inseticida botânico, o que impediu fêmeas do parasitoide de se aproximarem das pupas de *T. molitor* contaminadas (SIEGWART et al. 2015; BENELLI et al., 2017). Fato semelhante com o ocorrido com o parasitoide de pupas *Palmistichus elaeisis* Delvare e Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae), que também teve o parasitismo das fêmeas parentais reduzidos, com o mesmo produto a base de neem (CALDEIRA et al., 2022), e ao ocorrido com o parasitoide *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae), que teve o parasitismo reduzido pelo extrato aquoso de neem (50 gL⁻¹) e o óleo de neem (10 mL.L⁻¹) (CAÑARTE-BERMÚDEZ et al., 2020). Já a redução no parasitismo das fêmeas de *T. howardi* da geração TF2, provavelmente é devido ao efeito da azadiractina no sistema endócrino do inseto, que pode provocar redução dos níveis de hormônio juvenil, consequentemente da vitelogênese, provocando a redução da fecundidade e fertilidade dos insetos (LUNTZ; NISBET, 2000; ER; TAŞKIRAN, 2017; KOVAŘÍKOVÁ; PAVELA, 2019), uma vez que essa geração não teve o contato direto com o inseticida, mas apenas a geração parental e os imaturos da geração F1 que se desenvolveram em pupas contaminadas. Nosso resultado difere do encontrado para *P. elaeisis* que não teve o parasitismo da geração F2 transgeracional reduzida pela ação do óleo de neem (CALDEIRA et al., 2022). A redução do parasitismo interfere diretamente na eficiência do parasitoide como agente de controle biológico e em seus níveis populacionais, que podem ser também reduzidos, o que é prejudicial para a espécie.

A semelhança da longevidade das fêmeas de *T. howardi* contaminadas com o óleo de neem e a água demonstra segurança desse produto para esse parâmetro do parasitoide, que mesmo em contato com pupas de *T. molitor* contaminadas conseguiu viver um número de dias

satisfatório para a espécie. Diferente do encontrado para o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), com longevidade da geração F1 e F2 reduzidas quando expostos a azadiractina (PARREIRA et al., 2018). E do encontrado para o parasitoide de ovos *Trichogramma brassicae* Bezdenko (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que também teve a longevidade reduzida pela azadiractina (THUBRU; FIRAKE; BEHERE, 2018). Essas diferenças podem ser devido a fatores bióticos e abióticos, como às espécies diferentes de parasitoide, tendo um maior ou menor suscetibilidade a molécula inseticida, e a forma de exposição, ao produto utilizado, bem como a porcentagem de azadiractina presente em cada produto (RASHIDI et al. 2018). A manutenção da longevidade dos parasitoides é algo positivo para as espécies, pois isso proporciona mais tempo de busca por hospedeiros, o que pode favorecer o seu desempenho como agente de controle biológico.

A redução do número de indivíduos emergidos de *T. howardi* pela CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem nas gerações F1, MF3 e TF3, se deu pelo efeito da azadiractina na reprodução dos insetos, que reduziu a porcentagem de parasitismo dessa população e o número de ovos depositados no interior do hospedeiro, reduzindo, conseqüentemente, o número de parasitoides emergidos por pupa de *T. molitor*. A azadiractina reduziu também o número de indivíduos emergidos de *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) (FRANCESENA; SCHNEIDER, 2018), e de *T. pretiosum* (PARREIRA et al., 2018). Esses resultados corroboram com os nossos e evidenciam os efeitos prejudiciais do neem na reprodução de parasitoides, prejudicial para esses inimigos naturais, pois diminuem suas populações, o que foi mais evidente no ensaio multigeracional que simula sucessivas aplicações de uma mesma molécula em uma mesma área, em que a geração F3 exposta a CL₅₀ foi reduzida a zero indivíduos.

A semelhança do período ovo-adulto de *T. howardi* entre as concentrações do óleo de neem e a água, assegura esse produto para esse parâmetro em que os parasitoides não irão levar mais tempo do que o necessário para se tornarem adultos. Resultado parcialmente diferente do encontrado para o parasitoide *P. elaeisis* que não teve o período ovo-adulto alongado pela azadiractina nas gerações F2 e F3 transgeracionais, apenas na geração F1 (CALDEIRA et al., 2022). É interessante para o parasitoide que o período ovo-adulto seja curto, sobrepondo gerações, pois assim chegará mais cedo à fase adulta, fase responsável pelo parasitismo, controle das pragas e por assegurar suas próximas gerações.

A redução da razão sexual de *T. howardi* pela CL₁₀ e CL₅₀ do óleo de neem nas gerações MF2, MF3, TF2 e TF3, se deu pela maior sensibilidade das larvas fêmeas ao neem do que aquelas que geraram os machos. Semelhante ao observado na geração F1 do

parasitoide *T. pretiosum* (PARREIRA et al., 2018), do parasitoide *T. brassicae* (THUBRU; FIRAKE; BEHERE, 2018), e do parasitoide *E. mundus* (FRANCESENA; SCHNEIDER, 2018). O ideal é que a razão sexual de parasitoides seja alta, pois são as fêmeas responsáveis pelo parasitismo e por assegurar as gerações futuras (TIAGO et al. 2019; PEREIRA et al. 2009). Quanto menor a razão sexual, maior o risco de extinção local da população, como pode ser observado na exposição multigeracional, onde a população não conseguiu se reestabelecer nas gerações seguintes após exposição a CL₅₀ do óleo de neem.

A semelhança no comprimento da tíbia posterior de *T. howardi* entre as concentrações do óleo de neem e a água em todas as gerações, demonstra que a azadiractina não interfere nos recursos nutricionais do hospedeiro que é a única fonte de alimento para o parasitoide imaturo, e conseqüentemente na morfometria desse parasitoide. Resultado diferente foi observado para a geração F1 de *P. elaeisis*, que teve o comprimento da tíbia alongado por algumas concentrações de óleo de neem (CALDEIRA et al, 2022). Essa diferença pode ocorrer devido ao menor número de parasitoides se desenvolvendo em uma pupa contaminada do hospedeiro (COLINET; BOIVIN, 2011; BARBOSA et al., 2016). A semelhança no comprimento da tíbia é positivo para *T. howardi*, pois fêmeas com tamanho normal ou maiores asseguram um bom desempenho reprodutivo e de busca por hospedeiros.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A azadiractina apresentou efeitos de repelência e subletais para a população estudada de *T. howardi*, principalmente reduzindo a fecundidade e fertilidade das fêmeas parasitoides, provocando a extinção local da população na exposição multigeracional à CL₅₀ do óleo de neem. Portanto, a utilização desse produto a base de neem deve ser evitada em conjunto com liberações massais do parasitoide *T. howardi*, além das aplicações sucessivas do neem em curtos intervalos em um mesmo local em que ocorra a presença desse parasitoide.

REFERÊNCIAS

AGROFIT consulta aberta. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2023. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 15 de junho de 2023.

BARBOSA, R. H., ZANUNCIO, J. C., PEREIRA, F. F., KASSAB, S. O., ROSSONI, C. Foraging activity of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) at various densities on pupae of the eucalyptus defoliator *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). **Florida Entomologist**, v. 99, n. 4, p. 686-690, 2016.

BENELLI, G., CANALE, A., TONIOLO, C., HIGUCHI, A., MURUGAN, K., PAVELA, R., NICOLETTI, M. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 369-386, 2017.

CALDEIRA, Z.V., SOARES, M.A., VELOSO, R, V.S., SILVA, C.S., COSTA, E.S.P., SANTOS, M.M., SILVA, I.M., SILVA, W.M., ZANUNCIO, J.C. Acute and chronic toxicity of neem oil to the endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 115, n. 5, p. 1545-1550, 2022.

CAMPOS, E. V., DE OLIVEIRA, J. L., PASCOLI, M., DE LIMA, R., FRACETO, L. F. Neem oil and crop protection: from now to the future. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1494, 2016.

CAÑARTE-BERMÚDEZ, E., NAVARRETE-CEDENO, B., MONTERO-CEDENO, S., ARREDONDO-BERNAL, H. C., BAUTISTA-MARTÍNEZ, N., CHÁVEZ-LÓPEZ, O. Effect of neem on *Phyllocnistis citrella* Stainton and its parasitoid *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya in Ecuador. **Enfoque UTE**, v. 11, n. 2, p. 1-10, 2020.

COLINET, H., BOIVIN, G. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 83-95, 2011.

COSTA, E. S. P., SOARES, M. A., CALDEIRA, Z. V., VON DOS SANTOS VELOSO, R., DA SILVA, L. A., DA SILVA, D. J. H., SANTOS, I. C. L., CASTRO, B. M. C., ZANUNCIO, J. C., LEGASPI, J. C. Selectivity of deltamethrin doses on *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12395, 2020.

CRUZ, I., REDOAN, A. C., SILVA, R. B. D., FIGUEIREDO, M. D. L. C., PENTEADO-DIAS, A. M. New record of *Tetrastichus howardi* (Olliff) as a parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) on maize. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 252-254, 2011.

DUARTE, J. P., REDAELLI, L. R., SILVA, C. E., JAHNKE, S. M. Effect of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) Oil on the Immune System of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Immatures. **Journal of Insect Science**, v. 20, n. 3, p. 17, 2020.

ER, A., TAŞKIRAN, D., SAK, O. Azadirachtin-induced effects on various life history traits and cellular immune reactions of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Biological Sciences**, v. 69, n.2, p. 335-344, 2017.

FRANCESENA, N., SCHNEIDER, M. I. Selectivity assessment of two biorational insecticides, azadirachtin and pyriproxyfen, in comparison to a neonicotinoïd, acetamiprid, on pupae and adults of a Neotropical strain *Eretmocerus mundus* Mercet. **Chemosphere**, v. 206, p. 349-358, 2018.

HELPS, J. C., PAVELEY, N. D., BOSCH, F. V. D. Identifying circumstances under which high insecticide dose increases or decreases resistance selection. **Journal of Theoretical Biology**, v. 428, p. 153-167, 2017.

- KFIR, R.; GOUWS, J., MOORE, S. D. Biology of *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae): a facultative hyperparasitoid of stem borers. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 149-159, 1993.
- KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review Entomology**, v. 43, p. 243-70, 1998.
- KOVAŘÍKOVÁ, K., PAVELA, R. United forces of botanical oils: Efficacy of neem and karanja oil against colorado potato beetle under laboratory conditions. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 608, 2019.
- LUNTZ, A.J.M.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.4, p.615-632, 2000.
- MENEZES, C. W., SOARES, M. A., FONSECA, A. J., DOS SANTOS, J. B., CAMILO, S. D. S., ZANUNCIO, J. C. *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) as an indicator of toxicity of herbicides registered for corn in Brazil. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 3, p. 361-365, 2014.
- PARREIRA, D. S., ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R., ZANUNCIO, J. C., LEMES, P. G., DA SILVA ROLIM, G., BARBOSA, L. R., LEITE, G. L. D., SERRÃO, J. E. Essential oils cause detrimental effects on biological parameters of *Trichogramma galloi* immatures. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 887-895, 2018.
- PEARSON, K. On the theory of contingency tables and its relation to association and normal correlation. **Draper's Company Research Memoirs. Biometric Series**, v. 1, p. 443-475, 1904.
- PEREIRA, F. F., ZANUNCIO, J. C., SERRÃO, J. E., OLIVEIRA, H. N., FÁVERO, K., GRANCE, E. L. Progenie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L.(Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 660-664, 2009.
- PRÜTZ, G., BRINK, A., DETTNER, K. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: effects of *Bacillus thuringiensis*-corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 9, p. 451-454, 2004.
- RAMPELOTTI-FERREIRA, F. T., COELHO JR, A., PARRA, J. R. P., VENDRAMIM, J. D. Selectivity of plant extracts for *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.: Trichogrammatidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 78-82, 2017.
- RASHIDI, F., NOURI-GANBALANI, G., IMANI, S. Sublethal effects of some insecticides on functional response of *Habrobracon hebetor* (Hymneoptera: Braconidae) when reared on two lepidopteran hosts. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 3, p. 1104-1111, 2018.
- SIEGWART, M., GRAILLOT, B., BLACHERE LOPEZ, C., BESSE, S., BARDIN, M., NICOT, P. C., LOPEZ-FERBER, M. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 381, 2015.

SOARES, M. A., DOS SANTOS, M. M., DE CASTRO E CASTRO, B. M., DA SILVA, R. S., LEITE, G. L. D., PIRES, E. M., LIMA, E., ZANUNCIO, J. C. Intraguild interaction between the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) and the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Phytoparasitica**, p. 1-10, 2023.

SULLIVAN, D. J., VÖLKL, W. Hyperparasitism: multitrophic ecology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 291-315, 1999.

SZABÓ, B., SERES, A., BAKONYI, G. Distinct changes in the life-history strategies of *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) due to multi-and transgenerational treatments with an insecticide. **Applied Soil Ecology**, v. 152, p. 103563, 2020.

THUBRU, D. P.; FIRAKE, D. M.; BEHERE, G. T. Assessing risks of pesticides targeting lepidopteran pests in cruciferous ecosystems to eggs parasitoid, *Trichogramma brassicae* (Bezdenko). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 680-688, 2018.

TIAGO, E. F., PEREIRA, F. F., KASSAB, S. O., BARBOSA, R. H., CARDOSO, C. R. G., SANOMIA, W. Y., HELTER, C. P., ROSILDA, M. M. F. S., ZANUNCIO, J. C. Biological quality of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) reared with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae after cold storage. **Florida Entomologist**, v. 102, n. 3, p. 571-576, 2019.

VARGAS, E. L., PEREIRA, F. F., TAVARES, M. T., PASTORI, P. L. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. **Entomotropica**, v. 26, n. 3, p. 143-146, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diferentes métodos de exposição do parasitoide *T. howardi* ao óleo de neem demonstraram que a azadiractina não apresenta risco de toxicidade aguda ao parasitoide. Por outro lado, afeta parâmetros biológicos do inseto após exposição aguda, tais como redução no parasitismo e no número de indivíduos emergidos por hospedeiro, e prolongamento do ciclo ovo-adulto. O óleo de neem provocou também efeitos subletais após exposição multi e transgeracional, reduzindo a fecundidade e fertilidade das fêmeas parasitoides, provocando a extinção local da população na exposição multigeracional à CL₅₀ do óleo de neem. Esses efeitos subletais podem ser atenuados pela ação relente encontrada do neem ao parasitoide, no entanto, esses impactos podem prejudicar o desempenho e a manutenção de populações de parasitoides no campo, sendo necessário algumas estratégias na utilização conjunta dessas duas táticas de controle no manejo integrado de pragas, de forma que *T. howardi* não seja exposto diretamente ao óleo de neem, como fazer a liberação do endoparasitoide em períodos alternados aos da pulverização do inseticida.

