



Warley Rodrigues dos Santos

Utilização de nemátodes entomopatogénicos para o controlo biológico de pragas agrícolas

Orientador: Maria José Cunha

Versão Definitiva

Coimbra, 2019

“Utilização de nemátodes entomopatogénicos para o controlo biológico de pragas agrícolas”

Warley Rodrigues dos Santos

Utilização de nemátodes entomopatogénicos para o controlo biológico de pragas agrícolas

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de mestre em Agricultura Biológica

Orientador: Maria José Cunha

Versão Definitiva

Agradecimentos

A Deus, o que seria de mim sem a fé que tenho nele.

À professora Maria José Cunha pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao professor e coordenador do curso, pelo convívio, pelo apoio e pela compreensão no decorrer do curso.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida académica e no desenvolvimento desta dissertação.

À Escola Superior Agrária de Coimbra, por dar-me a oportunidade de fazer parte da mesma como aluno de mestrado.

À Biostasia, empresa de Biotecnologia em Portugal, que contribui com este trabalho, dando-me inspiração para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus pais e irmãos que acreditaram no meu potencial.

À minha esposa Elizângela Santos, que de forma especial e carinhosa deu-me força e coragem, apoiando-me nos momentos de dificuldades.

Ao meu filho Filipe Santos, que embora não tivesse conhecimentos disto devido aos seus apenas 5 anos de idade, iluminou de maneira especial os meus pensamentos levando-me a buscar mais conhecimentos.

A toda a minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços ao apoiar-me para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e apoio constantes.

Resumo

Os nemátodes são animais pseudocelomados, não segmentados e semelhantes a fio. Do grupo dos metazoários, são os animais mais abundantes da Biosfera (cerca de 80%), sendo conhecidos até agora cerca de vinte mil espécies. Dentro das espécies de nemátodes, há algumas associadas ao controlo biológico de insetos-praga, os nemátodes entomopatogénicos (NEPs).

Neste trabalho, abordamos duas famílias, *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae*, visto que podem ser produzidas em larga escala e empregues no controlo de pragas agrícolas. Assim, o principal objetivo desta dissertação é caracterizar e estudar o efeito dos NEPs no controlo biológico das pragas agrícolas (o escaravelho-da-palmeira e pragas da horta - pulgões, piolho e cochonilhas), comparar as vantagens e desvantagens face aos controlos químicos e analisar a sua produção industrial e armazenamento atualmente.

Para tal, foram escolhidos produtos diferentes à base de NEPs disponíveis para o combate a estes dois tipos de pragas muito comuns. Para o tratamento do escaravelho-da-palmeira foi analisado Palm Control 250 M (da Biostasia, Lda.); e para as pragas da horta, Decis 25EC e Lutabio (da Presto Bio S.A.).

Os resultados demonstram, quanto à praga do escaravelho-da-palmeira, que o produto utilizado se revelou eficaz como atitude preventiva. Quanto às pragas da horta (pulgões, moscas brancas, cochonilhas, lagartas, caracóis, entre outros), o tratamento da horta com recurso a NEPs permite preparar a terra, no início da época, e futuramente proteger o solo ao eliminar estas pragas.

Conclui-se que a aplicação de produtos à base de NEPs, para além de ser ecologicamente a mais correta e segura, é a melhor aposta para a prevenção e tratamento deste tipo de pragas. No entanto, num estado mais avançado da praga, a escolha deste tipo de produtos revela-se muito mais cara face aos químicos de síntese.

Palavras-chave: nemátodes entomopatogénicos, controlo biológico, pragas agrícolas.

Abstract

Nematodes are pseudocoelomates, non-segmented and similar to wire. From the metazoan group, they are the most abundant animals of the Biosphere (about 80%), so far known about twenty thousand species. Within nematode species, there are some associated with the biological control of insect pests, entomopathogenic nematodes (NEPs).

In this work, we discuss two families, *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*, since they can be produced on a large scale and used for the control of agricultural pests. Thus, the main objective of this dissertation is to characterize and study the effect of NEPs on the biological control of agricultural pests (palm beetles and horticultural pests, lice and scales), to compare the advantages and disadvantages of chemical controls and to analyze the its industrial production and storage currently.

For this, different products based on NEPs were chosen to combat these two types of very common pests. For the treatment of the palm beetle was analyzed Palm Control 250 M (from Biostasia, Lda.); and for the pests of the garden, Decis 25EC and Lutabio (Presto Bio S.A.).

The results demonstrate, as regards the pest of the palm beetle, that the product used proved effective as a preventive attitude. As for the pests of the garden (aphids, whiteflies, scales, caterpillars, caterpillars, snails, among others), the treatment of the garden with NEPs allows to prepare the earth at the beginning of the season and in the future protect the soil by eliminating these pests.

It is concluded that the application of products based on NEPs, besides being ecologically the most correct and safe, is the best bet for the prevention and treatment of this type of pests. However, in a more advanced stage of the pest, the choice of this type of product is much more expensive than the synthetic chemicals.

Key words: entomopathogenic nematodes, biological control, agricultural pests.

Índice

1. Introdução.....	10
1.1. Utilização de organismos entomopatogénicos na proteção de pragas das culturas	12
1.1.1. Filo Nematoda	12
1.1.2. Características dos nemátodes entomopatogénicos.....	13
1.1.3. Ciclo de vida dos nemátodes entomopatogénicos.....	15
1.2. Vantagens da utilização dos nemátodes entomopatogénicos.....	19
1.3. Limitações do uso de organismos entomopatogénicos	20
1.4. Produção de nemátodes entomopatogénicos	21
1.4.1. Meio sólido	22
1.4.2. Meio líquido	22
1.5. Produção em massa (industrial)	23
1.5.1. Produção in vivo: utilização de lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	23
1.5.2. Produção in vitro: meio de cultura	25
1.6. Formulação e armazenamento de nemátodes entomopatogénicos	25
1.7. Aplicação de NEPs e fatores que afetam a sua eficiência	27
1.7.1. Métodos de aplicação	28
1.7.2. Perspetivas futuras	29
2. Mercado dos Nemátodes Entomopatogénicos em Portugal.....	30
2.1. Caso de estudo 1: Controlo do escaravelho-da-palmeira (<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>) por nemátodes entomopatogénicos	31
2.1.1. Praga do escaravelho-da-palmeira (<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>).....	31
2.1.2. Principais espécies vegetais mais suscetíveis à praga do escaravelho-da-palmeira	32
2.2. Diagnóstico da praga	33
2.3. Controlo da praga.....	34
2.3.1. Época do tratamento	36
2.3.2. Palm Control 250M	36
2.3.2.1. Modo de ação do Palm Control 250M.....	37

2.4. Estimativa de custos dos tratamentos nas árvores afetadas	39
2.4.1. Ações de tratamento preventivas e curativas	39
2.5. Caso de Estudo 2 - Controlo de pragas da horta por nemátodes entomopatogénicos	45
2.5.1. Nemátodes contra as pragas da horta da marca Presto Bio.....	46
2.5.2. Tratamentos preventivos e curativos	47
3. Conclusões	51
4. Bibliografia.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Filo Nematoda – presença de pseudoceloma	13
Figura 2. Características de diferentes organismos vivos	13
Figura 3. (A) Nemátodo entomopatogénico - <i>Steinernema feltiae</i> ; (B) Nemátodes entomopatogénicos - <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	14
Figura 4. Características específicas dos NEPs.....	15
Figura 5. Constituição interna de um inseto	15
Figura 6. Principais espécie de insetos-praga (A) ordem dos dípteros ; (B) ordem dos coleópteros; (C) ordem dos lepidopteros.....	16
Figura 8. Ciclo de vida de um nemátodo entomopatogénico infetado	17
Figura 9. Principais vantagens dos nemátodes entomopatogénicos para a agricultura..	20
Figura 10. (A) <i>Bacillus thuringiensis</i> ; (B) NEPs.....	21
Figura 11. Modo de produção in vitro (meio líquido) de NEPs sob a forma granular..	23
Figura 12. Produção de <i>Steinernema carpocapase</i>	24
Figura 13. Larva de <i>Galleria mellonella</i>	24
Figura 14. Produção de NEPs in vitro realizada em grande escala	25
Figura 15. Controlo biológico de pragas através de NEPs - pulverização manual	28
Figura 16. (A): Efeito da praga do escaravelho-da-palmeira (<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>);	30
Figura 17. Fases do ciclo do escaravelho-da-palmeira.....	32
Figura 18. (A) Areca catechu, (B) Cocos nuucifera.	33
Figura 19. Produto à base de NEPs: Palm Control 250 M.	36
Figura 20. Mecanismos de atuação na eliminação da praga (A) sem quitosano; (B) com quitosano nas plantas.....	38
Figura 21. Tratamento das palmeiras atacadas pela praga-do-escaravelho.....	40
Figura 22. Pulverizador de alto débito para aplicação dos produtos à base de NEP e inseticidas	41
Figura 23. (A): pulgões; (B): mosca branca; (C): formigas; (D): cochonilhas	45
Figura 24. Imagem ilustrativa do produto Decis 25EC, um inseticida para controlo deste tipo de pragas.....	47
Figura 25. Imagem ilustrativa do produto Lutabio, um inseticida biológico	48

Índice de quadros

Quadro 1. Principais famílias de NEPs dos géneros Steinernematidae e Heterorhabditidae e sua atuação sobre as pragas.....	18
Quadro 2. Produtos comerciais disponíveis no mercado internacional, à base de NEPs	26
Quadro 3. Principais tipos de tratamento fitossanitário realizados com NEPs	35
Quadro 4. Principal época do ano e principais tratamentos a realizar com nemátodes entomopatogénicos e inseticidas	39
Quadro 5. Dosagens para o Tratamento Foliar, através de pulverização.	41
Quadro 6. Estimativa de custos, por tratamento foliar, para controlo do escaravelho-da-plameira, através de pulverização de palmeiras	42
Quadro 7. Custos anuais do tratamento foliar, através de pulverização de palmeiras ..	43
Quadro 8. Principais características dos NEPs usados contra pragas da horta da marca Presto Bio	46
Quadro 9. Dosagens para o tratamento das pragas da horta, através de pulverização ..	48
Quadro 10. Custo por tratamento mensal do Decis S.A. e Lutabio, para as pragas agrícolas.....	48
Quadro 11. Lista de produtos, com NEPs, disponíveis em Portugal para o combate das pragas da horta.....	50

1. Introdução

Um dos principais obstáculos para a criação e consolidação de uma agricultura mais sustentável e “verde” continua a ser o ataque de pragas a culturas agrícolas que, deixando de ser possível de serem controladas, podem reduzir drasticamente a produtividade de uma determinada cultura agrícola (Brooks & Haltstead, 2010; Saxena & Jenkins, 2014; Pretty & Bharucha, 2015).

Relativamente aos métodos de controlo e proteção deste tipo de pragas, o controlo químico continua a ser um dos métodos utilizados para este efeito (Khan & Damalas, 2014; Duarte *et al.*, 2016; Oliveira, 2017). Infelizmente, associado a este método de controlo de pragas ainda muito utilizado, verificam-se cada vez mais consequências graves provocadas pelo uso indiscriminado e muitas vezes descontrolado de inseticidas e pesticidas químicos principalmente em espécies não alvo. Associado aos fatores anteriormente referidos, verificam-se também efeitos alargados nomeadamente na contaminação do solo e água, consequência da lixiviação das águas e arrasto de nutrientes (Jadoski *et al.*, 2010; Martins & Fernandes, 2017). Têm-se encontrado também associados a esta problemática, resíduos químicos essencialmente nas hortícolas e frutícolas o que traz evidentemente consequências negativas na saúde e bem-estar do ser humano (Hu *et al.*, 2015; Molina-Alcaide, Romero-Huelva & Carro, 2017; Panghal *et al.*, 2017).

A utilização massiva e muitas vezes irracional de métodos de controlo químico traz também consequências na eficácia da utilização dos mesmos, uma vez que os insetos que provocam as pragas agrícolas são cada vez mais resistentes a estes produtos dificultando o seu combate e erradicação definitiva (Brida, 2018).

Os problemas anteriormente enunciados provocaram um impacto muito significativo na população agrícola e demais comunidades, evocando uma atenção cada vez maior para a procura de alternativas de controlo de pragas mais sustentáveis e seguras para todos (Machado, 2018). Se compararmos os pesticidas aos biopesticidas, verifica-se que os primeiros são as “substâncias que visam matar, controlar e/ou inibir organismos indesejados que possam por em causa uma dada cultura, podendo ser agrupados em herbicidas, fungicidas, insecticidas, de acordo com o grupo de organismos alvo, respectivamente ervas/plantas, fungos e insectos” (Coutinho *et al.*, 2010, p. 1). Já os

biopesticidas são um controlo biológico que “consiste na redução de populações de pragas através da introdução de inimigos naturais dos insectos, muitas das vezes microrganismos parasitas, predadores ou patógenos. A utilização destes agentes de controlo biológico tem constituído uma tímida alternativa aos pesticidas químicos devido, sobretudo, a dificuldades de produção e de manipulação dos organismos vivos, bem como ao reduzido número de insectos susceptíveis a estes agentes.” (Toubarro, 2010, p. 1). Por essa razão, o uso de biopesticidas, onde se inclui a utilização de organismos entomopatogénicos, têm sido considerados alternativas mais seguras e sustentáveis e que vão reunindo cada vez mais a preferência de muitos técnicos e produtores agrícolas (Almenara *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2018).

A maioria das doenças encontradas nas culturas são causadas por nemátodes, fungos, protistas, bactérias e vírus que podem causar danos e quebras de produtividade significativa nas culturas (Nicolau, 2016). O aparecimento de problemas fitossanitários nas culturas como pragas e doenças pode ser também fomentado por condições climáticas adversas. Exemplos disso são humidade elevada ou o crescimento populacional de espécies “invasoras”, que podem provocar desequilíbrios ambientais e produtivos (Martins, 2015).

Por essa razão, e respondendo à crescente procura por soluções mais sustentáveis e biológicas para combater este problema, o mercado dos nemátodes entomopatogénicos (NEPs) é um dos que tem crescido mais significativamente (Negrisoli *et al.*, 2015).

Efetivamente, os NEPs são entre os agentes de controlo biológico aqueles que mais têm recebido atenção por parte da comunidade científica, tendo por isso destaque nacional e internacional pelo facto de poderem ser produzidos de forma massiva (*in vitro*), reduzindo dessa forma o custo de produção (Sulistyanto, Ehlers & Simamora, 2018; Vidal *et al.*, 2018). De facto, a compatibilidade com diversos grupos químicos e biológicos, a sua eficiência com certas espécies que fazem parte do seu ciclo biológico no solo, a sua cessação ou persistência no ambiente e o facto de não serem tóxicos para o Homem e meio ambiente fazem dos NEPs alternativas cada vez mais viáveis para combater as pragas das culturas agrícolas de forma mais ecológica (Aguiar & Joaquim, 2014; Almenara *et al.*, 2012).

Segundo Poinar (1976) e Travassos (1927) citado por Negrisoli *et al.* (2015), existem dois géneros de NEPs, das dezenas de géneros existentes que se evidenciam: *Heterorhabditis*

e *Steinernema*. O maior interesse verificado nestes dois géneros anteriormente referidos deve-se sobretudo ao facto de poderem ser produzidos a uma escala muito mais extensa (industrial) e empregues na formulação de produtos agrícolas comercializados (como no controlo biológico de pragas agrícolas). Os primeiros relatos da utilização de NEPs (na década de 30) contam a experiência da utilização de NEPs no combate ao escaravelho-japonês, ou besouro-japonês, *Popillia japonica*, uma importante praga de plantas ornamentais (Almenara *et al.*, 2012). No entanto, só na década de 70 é que os NEPs para controlo biológico de pragas começaram a ser mais explorados (Almenara *et al.*, 2012).

Assim, o objetivo desta dissertação é: 1) caracterizar o efeito dos NEPs no controlo biológico das pragas agrícolas (pragas da horta) e do escaravelho-da-palmeira; 2) estudar o efeito dos NEPs no controlo biológico das pragas agrícolas (pragas da horta) e do escaravelho-da-palmeira; 3) comparar as vantagens e desvantagens face aos controlos químicos e; 4) analisar a sua produção industrial e armazenamento atualmente.

1.1. Utilização de organismos entomopatogénicos na proteção de pragas das culturas

Os NEPs são organismos com uma versatilidade extraordinária e de uma utilidade admirável contra muitos tipos de pragas, numa diversidade enorme de sistemas culturais (Almenara *et al.*, 2012; Brida, 2015).

1.1.1. Filo Nematoda

O filo Nematoda caracteriza-se por ter uma enorme diversidade no que diz respeito à riqueza de espécies que a ele pertencem, sendo por essa razão o filo de metazoários mais abundantemente presente no planeta Terra (Hugot *et al.*, 2001).

Segundo Almenara *et al.* (2012), as espécies presentes neste filo apresentam características morfológicamente semelhantes nomeadamente: corpo alongado e forma cilíndrica bem como presença de pseudoceloma (Fig.1).

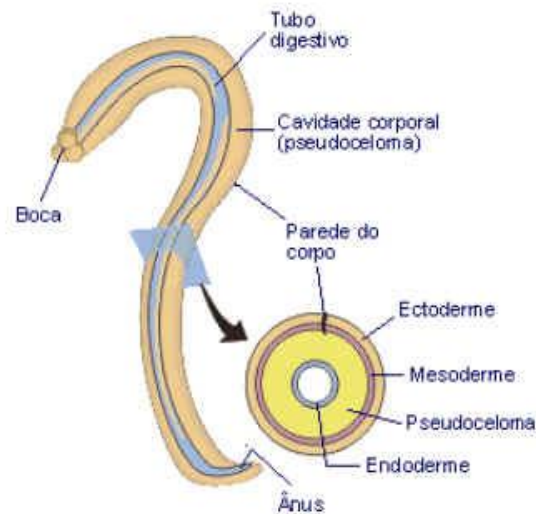


Figura 1. Filo Nematoda – presença de pseudoceloma

Fonte: <http://invertevoiceuneal.blogspot.com/2013/04/animais-pseudocelomados-os-vertebrados.html>

1.1.2. Características dos nematodes entomopatogénicos

Os organismos vivos podem ser usados para controlo biológico e assim diminuir outra população de organismos, considerada a praga. Seguindo este princípio, como se observa na Fig. 2, os organismos vivos usados para o controlo biológico podem assim ser chamados de predadores. Neste trabalho debruçamo-nos sobre os entomopatogénicos, que se revelam benéficos uma vez que parasitam pragas de insetos das culturas, sendo por isso essenciais no controlo biológico de pragas. Estas pragas são parasitas que podem provocar doenças em plantas, animais e humanos e assim danificar o meio-ambiente (Neves *et al.*, 1999).

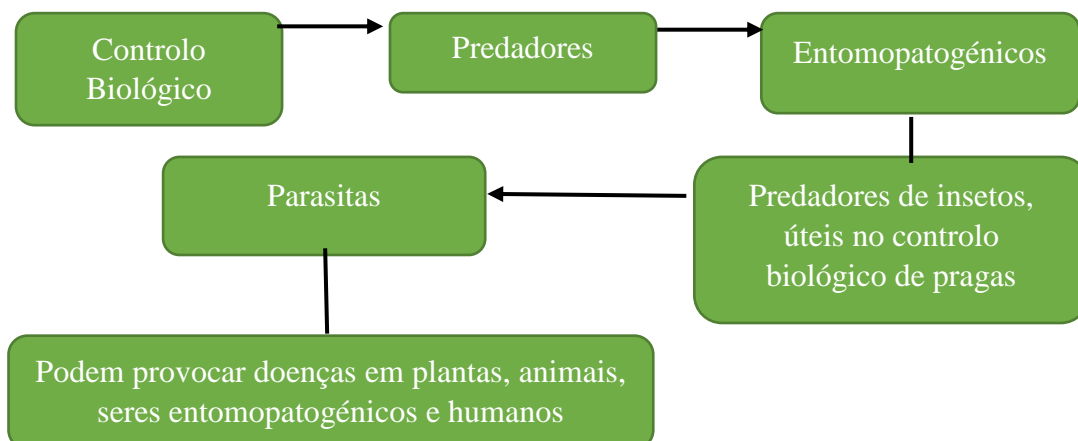


Figura 2. Características de diferentes organismos vivos

Fonte: Adaptado de Biostasia (s/d)

Os nemátodes que habitam no solo caracterizam-se por serem vermes com forma cilíndrica e de dimensões microscópicas que se podem estender de 558 a 1130 μm (Neves *et al.*, 1999).

No que diz respeito aos NEPs, é de toda a relevância destacar os dois géneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Fig.3A, Fig.3B) a que pertencem as várias espécies de NEPs mais usadas para produção e conseqüente comercialização (Almenara *et al.*, 2012) e que são predadores dos insetos (Neves *et al.*, 1999).

Fonte A: Planet Natural disponível em: [https://www.planetnatural.com/wp-](https://www.planetnatural.com/wp-content/uploads/2012/12/microscopic-nematodes.jpg)

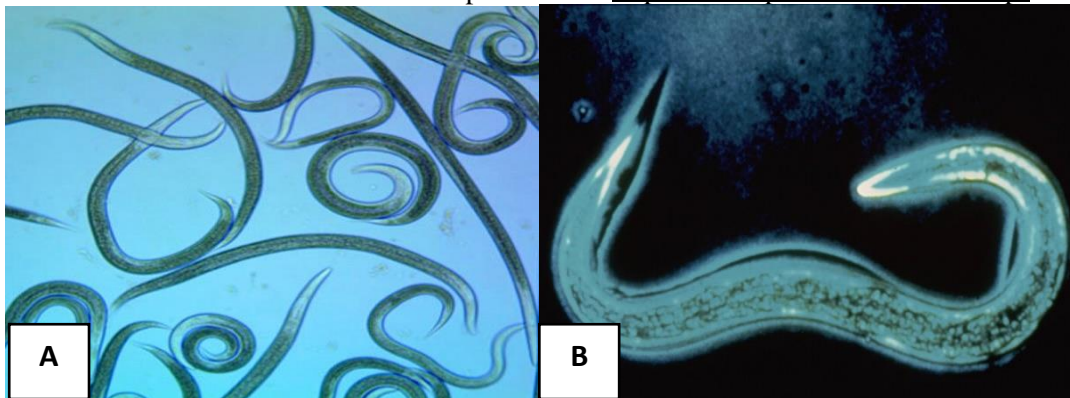


Figura 3. (A) Nemátodo entomopatogênico - *Steinernema feltiae*; (B) Nemátodes entomopatogênicos - *Heterorhabditis bacteriophora*.

[content/uploads/2012/12/microscopic-nematodes.jpg](https://www.planetnatural.com/wp-content/uploads/2012/12/microscopic-nematodes.jpg)

Fonte B: Nuetzlinge.de disponível em: [https://www.planetnatural.com/wp-](https://www.planetnatural.com/wp-content/uploads/2012/12/microscopic-nematodes.jpg)
[content/uploads/2012/12/microscopic-nematodes.jpg](https://www.planetnatural.com/wp-content/uploads/2012/12/microscopic-nematodes.jpg)

No género *Steinernema*, a sua bactéria simbiótica é *Xenorhabdus* spp. A bactéria infecta uma presa de inseto e enfraquece o seu sistema imunitário e o nemátode mata o inseto. Tanto o nemátode como a bactéria usam os nutrientes do cadáver para reprodução; os dois organismos reassociam e entram no solo para recomeçar o ciclo (Han & Ehlers, 2001).

As bactérias simbiotas de *Heterorhabditis* pertencem ao género *Photorhabdus*. O ciclo de vida destes pode ser dividido em três fases: a fase forética, na qual o nemátode transporta a bactéria até ao inseto hospedeiro; a fase patogénica, na qual a bactéria mata o inseto, e a fase saprofítica, na qual o nemátode se alimenta da bactéria e do cadáver do inseto bioconvertido por ela (Fig.4) (Gaugler, 2018).

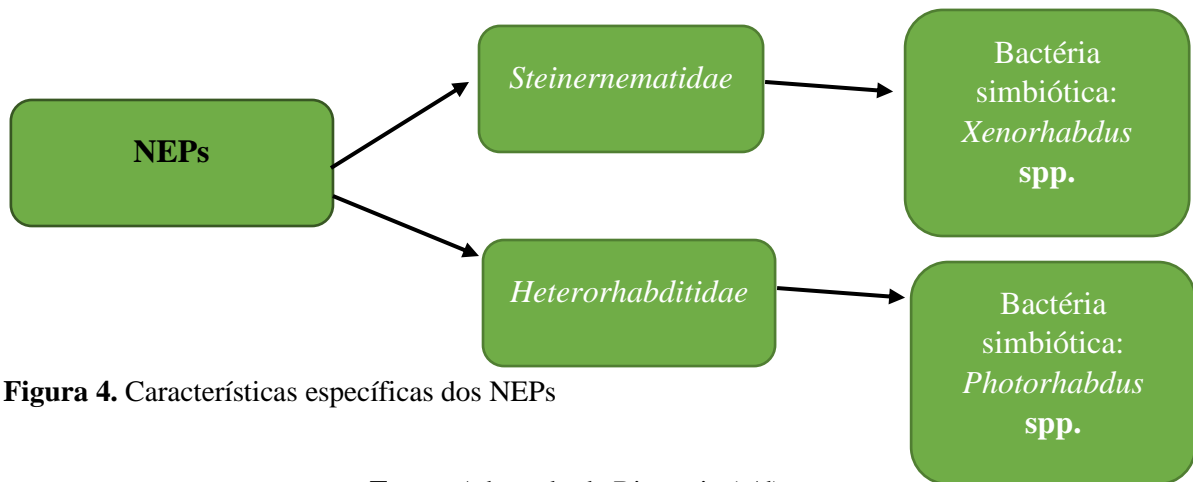


Figura 4. Características específicas dos NEPs

Fonte: Adaptado de Biostasia (s/d)

1.1.3. Ciclo de vida dos nemátodes entomopatogénicos

O ciclo de vida dos nemátodes envolve quatro etapas essenciais: ovo, quatro estádios juvenis (formas larvares que podem ser facilmente encontradas livremente no solo) e estádio adulto (Ritzinger *et al.*, 2010).

Os juvenis infetantes (JIs) caracterizam-se por serem organismos naturais do solo. Verifica-se que quando estes últimos entram em contato com o inseto hospedeiro, acabam por “penetrá-lo” através das suas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) mas também podem fazê-lo diretamente através da cutícula (Stilwell, 2018). Quando os JIs se encontram dentro do hospedeiro libertam as bactérias simbióticas no hemocélio do inseto (Fig. 5 e 6). Após esse processo, o inseto morre e os nemátodes entomopatogénicos tornam-se adultos.

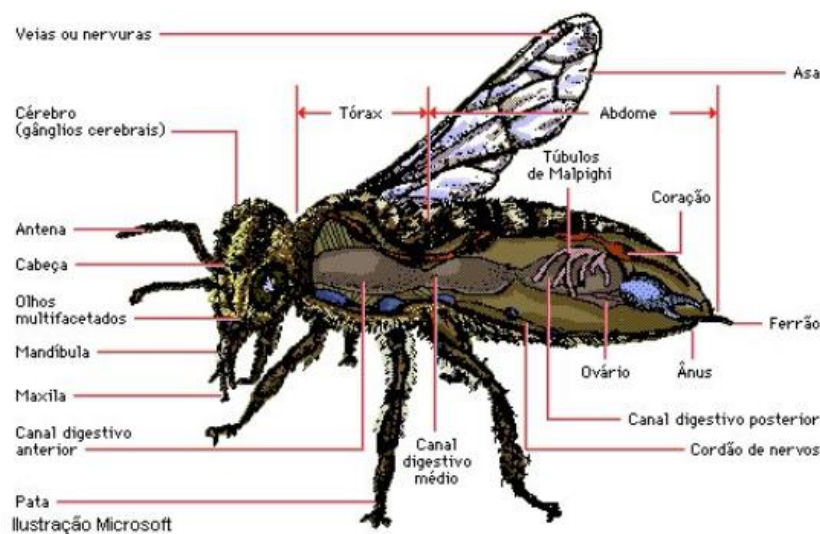


Figura 5. Constituição interna de um inseto

Fonte <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos3/bioartropodes2.php>

“Utilização de nemátodes entomopatogénicos para o controlo biológico de pragas agrícolas”

Isto acontece porque as bactérias multiplicam-se de forma muito rápida provocando a septicemia (infecção generalizada do inseto) o que origina posteriormente, a sua morte.

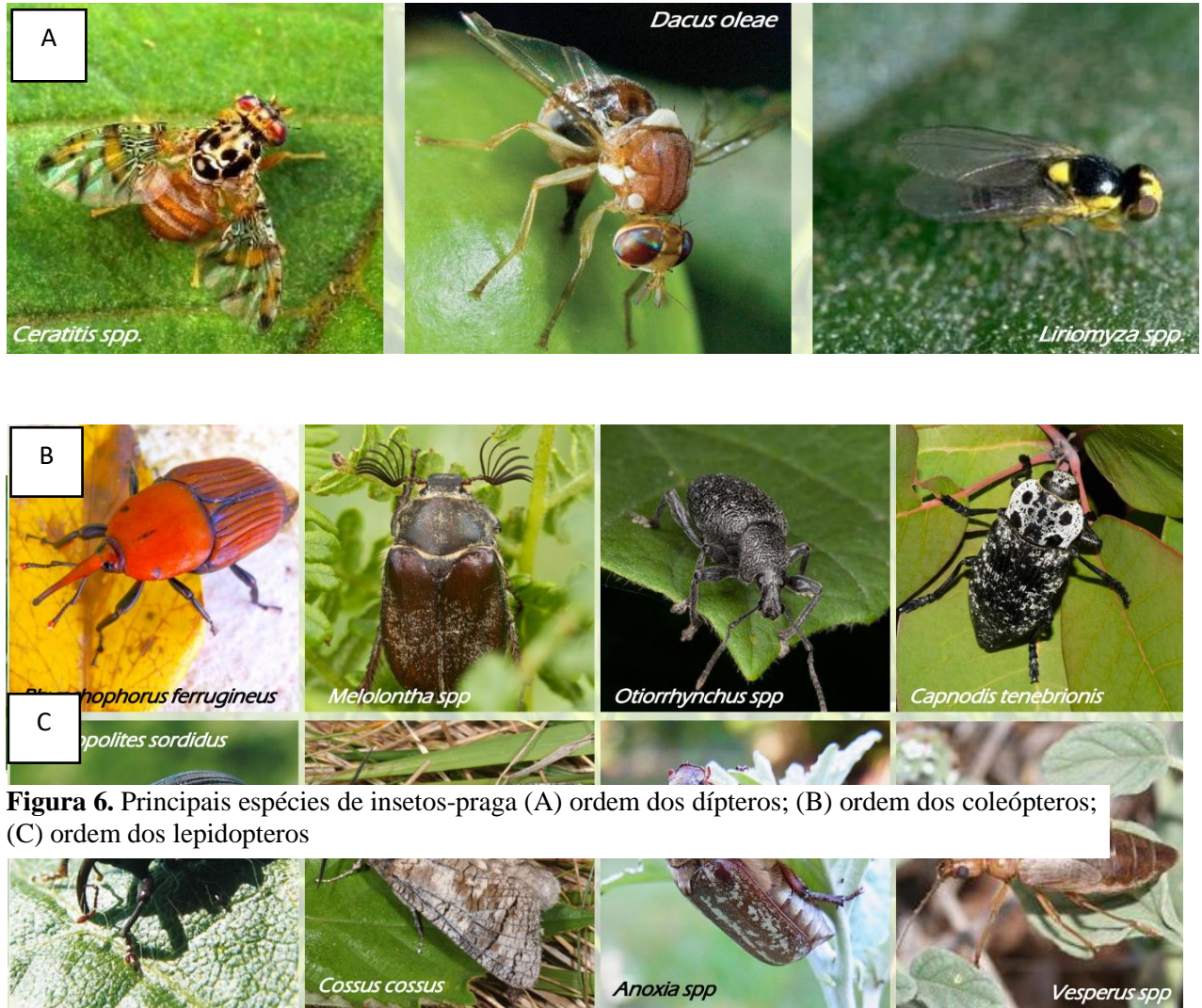


Figura 6. Principais espécies de insetos-praga (A) ordem dos dípteros; (B) ordem dos coleópteros; (C) ordem dos lepidópteros

Fonte: Adaptado de Biostasia (s/d)

Após essa fase, o ciclo repete-se novamente, com a saída da descendência à procura de um novo hospedeiro (Fig.6) (Singh & Upadhyay, 2018).

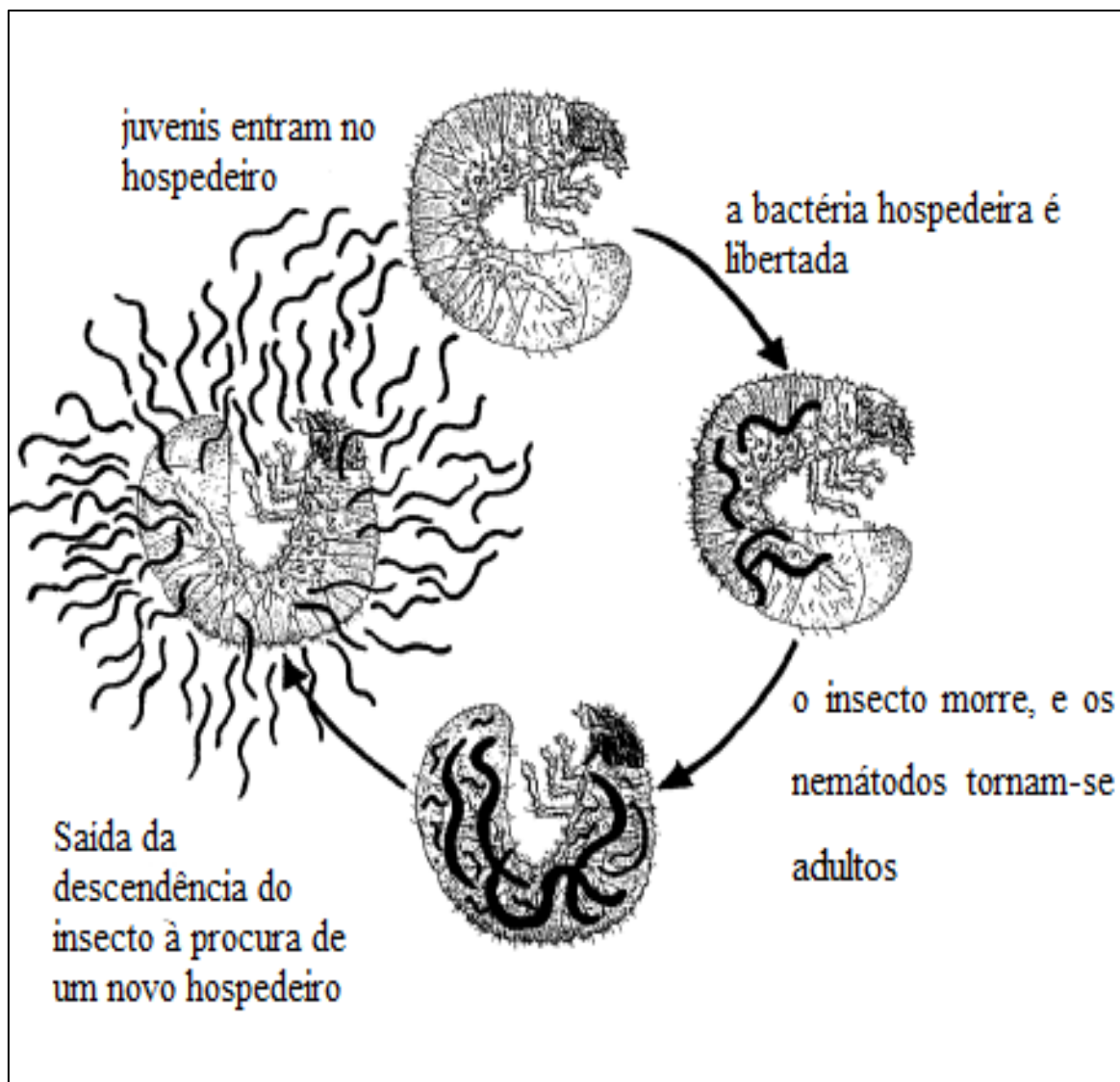


Figura 7. Ciclo de vida de um nemátodo entomopatogénico infetado

Fonte: Adaptado de Ehlers, 2001

Neste processo, as bactérias são também responsáveis por fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento e multiplicação dos nemátodes auxiliando dessa forma no controlo biológico das pragas agrícolas (Fig. 7) (Ehlers, 2001).

Segundo Wharton (1986) citado por Ritzinger *et al.* (2010), a morfologia de algumas espécies de NEPs (Quadro 1) é bastante semelhante quer no estágio juvenil quer no estágio adulto o que provoca muitas vezes dificuldades de identificação.

Quadro 1. Principais famílias de NEPs dos géneros Steinernematidae e Heterorhabditidae e sua atuação sobre as pragas

Culturas afetadas	Ordem	Família dos insetos	Nome científico	Nome comum	Nemátodes entomopatogénicos
Cogumelos	Diptera	<i>Sciaridae</i>	<i>Bradysis spp</i>	Mosquitos fúngicos	<i>S. feltiae</i>
Fruteiras		<i>Tephritidae</i>	<i>Ceratitis capitata</i> , <i>Bactrocera zonata</i>	Mosca do Mediterrâneo	<i>H.bacteriophor</i> , <i>S.feltiae</i> ,
Solo	Lepidoptera	<i>Tortricidae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Mariposa	<i>H. zealandica</i>
Pêssego		<i>Pyralidae</i>	<i>Grapholita molesta</i>	Traça da fruta	<i>S.carpocapsa e</i> , <i>S. feltiae</i>
Frutas de caroço		<i>Sesiidae</i>	<i>Synanthedon pictipes</i>	Broca	<i>S. pictipes and S. carpocapsae</i>
Avelãs		<i>Tortricidae</i>	<i>Melissopus latiferreanus</i>	Besouros	<i>S. carpocapsae</i>
Relvados		<i>Noctuidae</i>	<i>Agrotis ipsilon</i>	Minhocas negras	<i>H.bacteriophor</i> , <i>S.carpocapsa e</i>
Repolho		<i>Plutellidae</i>	<i>Plutella xylostella</i>	Traça de diamante (DBM)	<i>H. indica and S. glaseri</i>
Repolho		<i>Pieridae</i>	<i>Pieris rapae</i>	Borboleta do repolho	<i>H.bacteriophor</i>
Batata		<i>Gelechiidae</i>	<i>Phthorimaea operculella</i>	Traça da batata	<i>H. idica and S bacteriophora</i>
Amendoim	Coleoptera	<i>Scarabeidae</i>	<i>Holotrichia parallela</i>	Larva branca	<i>S. longicaudum</i>
Cucurbitáceas		<i>Chrysomelidae</i>	<i>Acalymma vittatum</i>	Escaravelho	<i>S. riobravus</i>
Hortícolas, plantas ornamentais	Thysanoptera	<i>Thripidae</i>	<i>Frankliniella occidentalis</i>	Tripes	<i>H.bacteriophora</i> , <i>S. feltiae</i>

Fonte: Adaptado de Singh e Upadhyay (2018)

1.2. Vantagens da utilização dos nemátodes entomopatogénicos

A luta microbiológica tem-se revelado cada vez mais como uma alternativa viável à luta química devido às suas numerosas vantagens em termos ambientais, devido à sua toxicidade baixa ou praticamente nula para o Homem e o reduzido risco de contaminação ambiental (Torres, 2011).

A sua rápida capacidade de reprodução e dispersão pelo ar é também uma das mais atraentes vantagens da utilização de nemátodes, o que poderá acarretar repercussões importantes a médio e longo prazo no combate de pragas agrícolas por esta via (Almenara *et al.*, 2012). Uma vez que os NEPs são organismos com capacidade de evolução, tal como os insetos, possuem uma menor probabilidade de aparecerem e desenvolverem resistência a estes, tornando todo o controlo de pragas muito mais eficaz (Blaxter, 1998).

Torna-se importante referir que muitos dos organismos entomopatogénicos como por exemplo os inseticidas microbiológicos, podem ser usados de outras formas para além da forma isolada. Muitas vezes este tipo de organismos são usados em conjunto com outros meios de proteção, nomeadamente métodos de controlo químicos (Torres, 2011).

Os organismos entomopatogénicos podem ter um lugar muito relevante como métodos de controlo utilizados no modo de proteção integrada uma vez que preservam os auxiliares que podem ter uma ação importante na limitação natural dos principais inimigos das culturas agrícolas (Leite, 2016).

Relativamente à utilização de NEPs, esta possui várias vantagens para o setor agrícola, culturas e meio ambiente, como observado na figura 8. Primeiramente, a utilização de NEPs revela-se muito persistente e eficaz no controlo biológico de pragas de insetos. Como já foi referido, a sua utilização revela-se também muito vantajosa em termos de segurança, uma vez que se revela segura (não são tóxicos) para as culturas, ambiente e aplicador. Os NEPs podem ser utilizados de forma preventiva evitando ataques de pragas e minimizando possíveis prejuízos, mas também de forma curativa, atuando na “raíz” do problema. A sua fácil utilização é também uma das vantagens que mais se destaca, podendo ser aplicados através do recurso de equipamentos de pulverização ou também através da sua aplicação em sistemas de irrigação convencionais (Almenara *et al.*, 2010).

O uso de NEPs revela-se compatível com outros métodos de gestão integrada de pragas e/ou programas de controlo biológico das mesmas. Para além disso, possui a vantagem

de controlar várias fases do ciclo de vida dos insetos, durando mais tempo que o tradicional pesticida químico (Fig. 9).



Figura 8. Principais vantagens dos nemátodes entomopatogénicos para a agricultura

Fonte: disponível em: <https://nematologia.com.br/tag/nematoides-entomopatogenicos/page/2/>

1.3. Limitações do uso de organismos entomopatogénicos

Infelizmente, os NEPs não possuem apenas vantagens. Os microrganismos possuem também limitações no que diz respeito à sua utilização, justificando o facto de esta não ser ainda alargada e ampla. Uma das principais limitações relativas à sua utilização tem cariz ambiental. De facto, os organismos entomopatogénicos são bastante sensíveis a fatores climáticos, principalmente radiações ultravioleta. Um outro entrave é o facto de serem difíceis de armazenar à temperatura ambiente, o que pode afetar a sua ação e

eficácia de atuação no combate às principais pragas agrícolas. Por outro lado, o ainda reduzido conhecimento sobre o modo de ação bem como o ciclo de vida destes organismos entomopatogénicos, têm sido um dos responsáveis pelo insucesso da sua utilização, verificado em muitos dos casos, bem como à baixa adesão por parte dos produtores agrícolas. É de salientar que, infelizmente, alguns destes produtos não têm aumentado a sua popularidade no mercado porque não competem com os pesticidas sintéticos. Ainda assim, dentro deste tipo de organismos, o *Bacillus thuringiensis* (Fig. 10A) e os nemátodes entomopatogénicos (Fig. 10B) têm ganho cada vez mais destaque, pelo que podem ser uma aposta ganha no que diz respeito ao controlo biológico de pragas agrícolas (Torres, 2011).

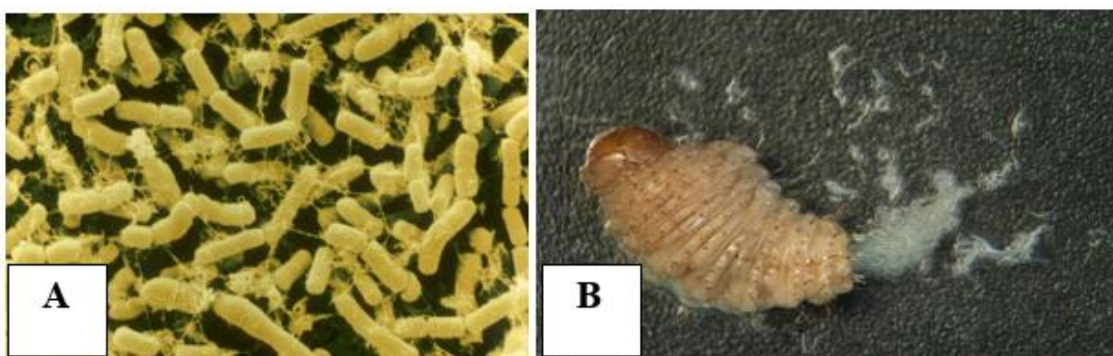


Figura 9. (A) *Bacillus thuringiensis*; (B) NEPs

Fonte A: Liberal Dictionary disponível em: <http://www.liberaldictionary.com/bacillus-thuringiensis/>

Fonte B: ElProdutor.com disponível em: <https://elprodutor.com/wp-content/uploads/2015/08/Foto-3.jpg>

1.4. Produção de nemátodes entomopatogénicos

Para a sua utilização comercial, tem de haver produção dos NEPs em grandes quantidades. Ultimamente, tem-se verificado avanços científicos significativos relativamente à produção em massa (industrial) de NEPs dos géneros mais procurados e comercializados, *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Barbosa, 2005).

Existem dois métodos de produção de nemátodes: *in vivo* e *in vitro*. Segundo Neves *et al.* (1998) citado por Barbosa (2005), a produção *in vitro* tem como principal vantagem a redução de custos, possibilitando um resultado padrão, com maior estabilidade e

viabilidade. A produção *in vivo*, devido à possibilidade de produção em massa, torna os produtos mais competitivos no mercado reduzindo o seu custo de produção e comercialização.

Ultimamente, a produção de NEPs a uma escala mais alargada (comercial) permitiu um desenvolvimento deste tipo de produtos mais significativo e tecnologicamente mais inovador (Ehlers, 2001). Verifica-se que atualmente é cada vez mais exequível produzir NEPs a custos cada vez mais competitivos tendo como base de comparação o mercado convencional de produtos fitofarmacêuticos utilizados no controlo químico de pragas agrícolas (Sulistyanto *et al.*, 2018).

1.4.1. Meio sólido

A cultura em meio sólido permite obter bons rendimentos (produção em média de 106 juvenis infetantes por cada grama de meio de cultura) (Almenara *et al.*, 2012). Friedman (1990) citado por Almenara *et al.* (2012) afirma que esta técnica de produção *in vitro* consiste basicamente na utilização de um suporte inorgânico (principalmente esponja de poliuretano) embebido num caldo homogéneo de tecidos animais. A utilização de um óleo ou gordura animal também faz parte deste tipo de meios. É um método com bastante flexibilidade e com custos reduzidos pelo que representa uma boa opção.

1.4.2. Meio líquido

As técnicas de produção de NEPs em meio líquido e fermentadores, através do processo de fermentação, são de entre os métodos de produção deste tipo de organismos as mais utilizadas para produção em larga escala (produção em massa). A produção de nemátodes por este método de fermentação líquida exige a manutenção do nível de O₂ e remoção do CO₂ bem como dos gases tóxicos que impedem a multiplicação dos NEPs (Singh & Upadhyay, 2018). Neste processo de produção de nemátodes em meio líquido através de um fermentador líquido simbiótico, as bactérias são introduzidas em primeiro lugar, seguidas dos NEPs (Singh & Upadhyay, 2018). Após a sua produção em grande escala, são comercializados em forma granular (Fig.11) através de um portador inerte (Biostasia, s/d).



Figura 10. Modo de produção *in vitro* (meio líquido) de NEPs sob a forma granular

O método de produção *in vitro* quando comparado com a produção *in vivo*, apesar de permitir a produção de NEPs em grandes quantidades, apresentam ainda alguns problemas e desvantagens. O rendimento das culturas apresenta ainda muitas variações, não sendo possível prever de forma precisa nem ter garantias de controlo da qualidade nas suas formulações (o que pode estar relacionado com os processos de arejamento e agitação dos fermentadores, que são responsáveis por diminuir significativamente as taxas de reprodução) (Almenara *et al.*, 2012).

1.5. Produção em massa (industrial)

1.5.1. Produção *in vivo*: utilização de lagartas de *Galleria mellonella*

A primeira técnica realmente operacional de produção em massa de *S. carpocapsae* (Fig.12) foi desenvolvida nos Estados Unidos e baseia-se no parasitismo de um inseto por um nemátode, necessitando por essa razão de um hospedeiro vivo de insetos (Singh & Upadhyay, 2018). O inseto hospedeiro mais comum usado para produção de NEPs *in vivo* é a lagarta de *Galleria mellonella* (Fig. 12) (Barbosa, 2005).



Figura 11. Produção de *Steinernema carpocapse*



Figura 12. Larva de *Galleria mellonella*

A técnica de produção em massa é uma técnica simples, mas cujo custo de produção é consideravelmente elevado pelo que não permite uma economia de escala. De facto, a duplicação da capacidade de produção requer simultaneamente a duplicação da área e do capital, o que pode tornar-se inoportável e inconcebível (Han & Ehlers, 2001). A este facto acresce que se o processo não for automatizado o custo da mão-de-obra aumenta linearmente, uma vez que o processo exige muita mão-de-obra humana e com uma certa qualificação (Singh & Upadhyay, 2018).

Além do mais, a multiplicação, em paralelo, de um inseto hospedeiro é extramente dificultada pelo que se revela muito difícil uma economia de escala. Tão importante como os aspetos referidos, é o facto de não haver uma economia de qualidade na ampliação da escala, antes pelo contrário. À medida que a escala de produção aumenta, a produção de

nemátodes é cada vez mais sensível aos surtos epidémicos tão característicos das práticas culturais com um maior grau de intensificação e produção.

1.5.2. Produção *in vitro*: meio de cultura

A produção *in vitro* (Fig.14) de NEPs em meio de cultura, pode ser realizada em meio sólido bem como em meio líquido (processo de fermentação).



Figura 13. Produção de NEPs *in vitro* realizada em grande escala

Fonte: Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/noticias/uso-de-controle-biologico-cresce-e-ib-auxilia-empresas-a-produzir-organismos-usados-no-combate-de-pragas-e-doencas>

1.6. Formulação e armazenamento de nemátodes entomopatogénicos

Considera-se que a formulação comercial correta deste tipo de produtos é um pré-requisito muito importante para a aplicação de um antagonista para o controlo biológicos de pragas agrícolas. Dentro das formulações comerciais deste tipo de produtos existe uma diversidade muito grande que foi desenvolvida essencialmente, para facilitar o armazenamento de NEPs em campo, como por exemplo: géis de carvão vegetal, alginato, poliacrilamida, argila, turfa, poliuretano, esponja vermiculite bem como grânulos dispersíveis em água. Os NEPs ativos devem ser imobilizados para garantir a estabilidade de suas reservas de lípidos e glicogénio. Estes organismos entomopatogénicos, dependendo da sua espécie (Quadro 2) e meios utilizados para armazenamento são formulados para serem armazenados por um período de 2 a 5 meses (Singh & Upadhyay, 2018).

Quadro 2. Produtos comerciais disponíveis no mercado internacional, à base de NEPs

Espécies de nemátodes entomopatogénicos	Nome da formulação do produto	País
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Biosafe, Biovector	EUA
	Sanoplant	Suiça
	Boden Nutz;linge	Alemanha
	Helix	Canadá
	Green commandos, Soil commandos	India
<i>Steinernema feltiae</i>	Nemasys	Reino Unido
	Entonem	EUA
	Nemaplus	Austria
<i>Steinernema riobrave</i>	Vector MG	EUA
<i>Heterorhabditis megidis</i>	Nemasys	Reino Unido
	Larva nema	EUA
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Cruiser, Nematop, Nema green	EUA

Fonte: Adaptado de Singh e Upadhyay (2018)

O armazenamento dos produtos à base de NEPs pode ser feito, consoante a espécie, num intervalo de temperaturas relativamente restrito (Grewal, 2000).

O armazenamento de NEPs a baixas temperaturas (2-7°C) acaba por, geralmente suspender a sua atividade metabólica, aumentando dessa forma a sua vida útil. No entanto, verificam-se exceções em algumas espécies como é o caso de *H. indica* e *S. riobrave* em que se verifica que não armazenam bem a uma temperatura inferior a 10°C (Grewal, 2000). A qualidade do produto à base de NEPs pode ser determinada pela

virulência, ensaios de viabilidade, idade, assim como através da razão entre os nemátodes viáveis a não viáveis (Grewal *et al.*, 2005)

1.7. Aplicação de NEPs e fatores que afetam a sua eficiência

Os NEPs têm provado em muitos dos casos que podem ser alternativas ecologicamente viáveis e eficazes de pesticidas químicos. No entanto, em muitos outros, isto ainda não se verifica uma vez que estes ainda não conseguem competir com o sucesso e banalização de que o uso de pesticidas químicos tem sido alvo (Vashisth, 2013).

Muito dos resultados desanimadores e negativos que têm sido verificados com o uso de NEPs resultam de falhas durante as fases do manuseamento, transporte e armazenamento dos produtos à base destes organismos (Almenara *et al.*, 2012).

A eficácia do uso de NEPs pode ser incrementada com o recurso a novas ferramentas tecnológicas na sua própria produção, bem com melhorias na formulação dos produtos e uma fiscalização da qualidade mais apertada e rigorosa. Também uma melhoria nas condições de armazenamento, o tempo de aplicação destes produtos e entrega destes ao produto agrícola representam medidas que podem ser postas em prática para que dessa forma se consiga aumentar a eficácia destes produtos (Singh & Upadhyay, 2018).

As condições de aplicação destes organismos vivos podem ser afetadas por fatores bióticos (bactérias, fungos, microrganismos, protozoários, ácaros, entre outros) e abióticos (temperatura, humidade, pH do solo, luz UV, entre outros) (Singh & Upadhyay, 2018). No solo, os juvenis infetantes podem ser atacados por vários fatores bióticos enunciados acima e que podem atuar como antagonistas dos NEPs, pelo que devem merecer por parte do aplicador o máximo de atenção. Pelo contrário, as espécies *Paenibacillus popilliae* e *Bacillus thuringiensis* trabalham sinergicamente com os NEPs (Brida, 2018).

O tipo de solos bem como o seu pH são dos fatores que mais influenciam a eficiência destes organismos, sendo que se verifica que em solos arenosos com pH entre 4 e 8 a eficiência dos NEPs é substancialmente superior (Singh & Upadhyay, 2018).

As variações de temperatura pertencem também ao grupo de fatores que pode influenciar a eficácia da aplicação dos NEPs no controle biológico de pragas, sendo a temperatura um dos fatores que mais afeta a sobrevivência dos NEPs. Os NEPs têm uma gama de

temperatura limitada, entre os 20 a 30°C. Após a sua aplicação, a humidade da área onde foi realizado o tratamento com NEPs (fator que pode comprometer a eficiência dos NEPs) deve ser mantida húmida para não comprometer a eficácia do tratamento.

1.7.1. Métodos de aplicação

O método de aplicação mais comumente utilizado para aplicação dos NEPs é a pulverização direta (Fig.15), podendo ser aplicados com quase todos os equipamentos de agricultura e horticultura recorrendo a pulverizadores manuais em áreas mais reduzidas (Ehlers, 2001).



Figura 14. Controlo biológico de pragas através de NEPs - pulverização manual

Fonte: adaptado de (Biostasia, s.d.)

A aplicação de NEPs deve ser feita diluída em água ou algum líquido apropriado aplicado diretamente no solo. Os NEPs podem também ser aplicados na rega gota a gota ou nas folhas (aplicação foliar) (Biostasia, s/d).

Como cuidados de utilização e segurança deste tipo de produtos para controlo biológico de pragas agrícolas deve-se garantir que, quando aplicados, as suas embalagens devem ser totalmente consumidas o momento que são abertas (não devendo ser armazenadas sob diluição após esse momento).

A aplicação de NEPs qualquer que seja o modo de aplicação escolhido deve garantir que não seja efetuada a altas temperaturas (superiores a 35°C) e que todos os filtros dos equipamentos de rega sejam retirados.

A taxa de aplicação dos nemátodes pode ser aumentada ou diminuída de acordo com a praga-alvo que se pretende tratar e as suas condições de aplicação (dose média recomendada para qualquer espécie de NEPs de 25 juvenis infetantes por cm²) (Singh & Upadhyay, 2018).

1.7.2. Perspetivas futuras

Têm-se verificado avanços significativos gradativos no que diz respeito à produção a uma escala mais alargada (produção em massa) de NEPs. Estes avanços são sobretudo observados na descoberta crescente de espécies de NEPs eficazes aliado à consciencialização por parte da população que a diminuição de produtos fitossanitários de origem química é cada vez mais imperativa para garantir a sustentabilidade do planeta (Negrisoni *et al.*, 2015). Tais acontecimentos enunciados anteriormente têm contribuído para um crescente interesse da comunidade científica e empresas a este mercado relacionadas na produção e comercialização de NEPs por todo o mundo, aumentando o interesse na realização de ensaios em laboratório para otimização de resultados deste tipo de organismos entomopatogénicos.

2. Mercado dos Nemátodes Entomopatogénicos em Portugal

Neste segundo ponto, será feita uma abordagem ao mercado dos NEPs em Portugal, caracterizando o efeito dos mesmos no controlo biológico das pragas agrícolas, sendo avaliados os diferentes produtos à base de NEPs disponíveis para venda ao consumidor final/ produtor agrícola. Para tal, foi feita uma pesquisa ao mercado destes produtos avaliando as diferentes alternativas disponibilizadas, comparando-os com outras alternativas de métodos de proteção e tratamentos fitossanitários nomeadamente proteção integrada. O objetivo deste ponto é sensibilizar a população para a utilização de produtos de tratamento fitossanitário mais *eco-friendly*, através da informação recolhida e aqui explanada, mesmo que isso implique um investimento superior, pois será garantido uma maior sustentabilidade do setor agrícola. Será feito, ainda, o estudo de mercado para dois tipos de pragas muito comuns em Portugal: a praga do escaravelho-da-palmeira (*Rhynchophorus ferrugineus*) e as pragas mais usuais de uma horta (pulgões, piolho e cochonilhas) (Fig. 16).

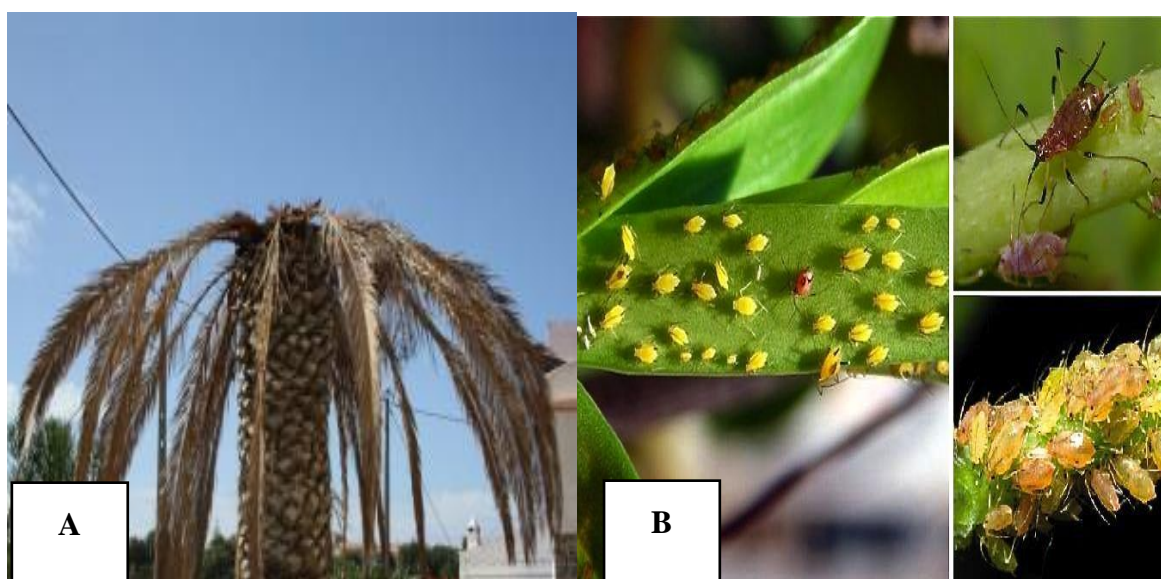


Figura 15. (A): Efeito da praga do escaravelho-da-palmeira (*Rhynchophorus ferrugineus*); (B): principais pragas da horta: pulgões, piolho e cochonilhas

Fonte A: Jornal do Algarve, disponível em: <https://i1.wp.com/www.jornaldoalgarve.pt/wp-content/uploads/2010/11/escaravelho-palmeira.jpg?resize=300%2C200&ssl=1>

Fonte B: Flores e Folhagens, disponível em: <http://www.floresefolhagens.com.br/wp-content/uploads/2015/07/Pragas-de-Jardim-1-16.jpg>

2.1. Caso de estudo 1: Controlo do escaravelho-da-palmeira (*Rhynchophorus ferrugineus*) por nemátodes entomopatogénicos



2.1.1. Praga do escaravelho-da-palmeira (*Rhynchophorus ferrugineus*)

O escaravelho-da-palmeira, também conhecido cientificamente como *Rhynchophorus ferrugineus*, representa uma das pragas mais importantes e que causa prejuízos mais significativos (Torres, 2011). Esta praga provocado pelo escaravelho caracteriza-se morfológicamente por ser vermelho alaranjado e possuir uma cabeça caracterizada por ter um bico, com dimensões aproximadas entre 1,5 e 5 cm de comprimento.

Relativamente ao seu ciclo de vida, este é constituído pelas seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 17). Possui 4 gerações anuais, sendo as larvas do escaravelho alimentadas no interior da palmeira, escavando para o efeito galerias o que provoca graves estragos.



Figura 16. Fases do ciclo do escaravelho-da-palmeira

Fonte: adaptado de (Biostasia, s.d.)

2.1.2. Principais espécies vegetais mais suscetíveis à praga do escaravelho-da-palmeira

A praga do escaravelho-da-palmeira afeta várias espécies vegetais, destacando-se principalmente as que se encontram principalmente nos jardins e espaços públicos nomeadamente: *Areca catechu* (Fig. 18A), *Arecastrum romanzoffianum*, *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, *Brahea armata*, *Butia capitata*, *Calamus merillii*, *Caryota maxima*, *Caryota cumingii*, *Chamaerops humilis*, *Cocos nucifera* (Fig. 18B), *Corypha gebanga*, *Corypha elata*, *Elaeis guineensis*, *Howea forsteriana*, entre outras.



Figura 17. (A) *Areca catechu*, (B) *Cocos nucifera*.

2.2. Diagnóstico da praga

Nos estádios iniciais do ciclo de vida desta praga, verifica-se que a sua identificação é mais difícil uma vez que a sua população se encontra numa densidade baixa, razão pela qual não causa danos significativos. No entanto, verifica-se que com o avançar dos estádios do escaravelho, a identificação desta praga torna-se mais fácil e rápida (Quadro 3). O grau de infestação desta praga depende de vários fatores sendo o grau de infestação e a saúde da palmeira sob ataque dos que mais se destacam.

A vigilância frequente das plantas mais suscetíveis a esta praga é fundamental, sendo por isso primordial analisar os estragos. Segundo os avisos agrícolas (2014), os sinais obtêm-se recorrendo para tal a armadilhas específicas com feromonas. Através desta técnica, o odor libertado através destas substâncias irá atrair os escaravelhos ajudando a controlar a praga. Este tipo de armadilhas devem estar localizadas a uma distância mínima de 50 metros da árvore afetada, uma vez que de outra maneira eles podem ajudar a atrair a praga para a sua árvore.

De salientar que se observa, ainda, a presença de casulos no chão, folhas desprendidas da coroa e caídas no chão, orifícios e galerias na base das folhas, entre outros. As folhas mais novas podem apresentar-se recortadas em ângulo ou com pontas truncadas a direito.

Depois do ataque da praga, o escaravelho abandona a árvore e encaminha-se para outra palmeira (Avisos agrícolas, 2014).

Segundo ensaios efetuados anteriormente por vários autores (Fernandes, 2015; Neves, 2011; Torres, 2011) dentro desta área de atuação, verificou-se que a aplicação de NEPs e pesticidas químicos é possível na maior parte dos casos. É importante salientar no entanto que, a compatibilidade com biopesticidas não é tão universal, havendo muitos casos de antagonismos. Na maioria destes casos, não ocorre infeção por duas espécies de NEPs simultaneamente (Fernandes, 2015). O que se observa nestes casos é que a primeira espécie de NEP a chegar ao hospedeiro é a única a conseguir desenvolver-se (Neves, 2011). Geralmente os fungos entomopatogénicos e os nemátodes não se revelam compatíveis do ponto de vista do desenvolvimento de cada um destes biopesticidas. Em relação à utilização conjunta de nemátodes e auxiliares artrópodes, os resultados obtidos parecem estar dependentes do momento de cada aplicação e variam consoante cada caso (Torres, 2011).

2.3. Controlo da praga

Para que o controlo desta praga seja o mais eficaz possível, é fundamental que se dê resistência ao hospedeiro onde a praga se aloja (neste caso dentro da palmeira) e seguidamente o procedimento oposto, eliminando o máximo possível a resistência ao inseto durante as suas quatro fases do ciclo de vida (Neves *et al.*, 1999). Desta forma, com este comportamento, será mais fácil conferir uma maior vitalidade à planta e diminuir os fatores de resiliência deste inseto, através de tratamentos tais como a pulverização ou aplicação foliar, entre outros.

A metodologia de tratamento fitossanitário consiste numa calendarização em que estão assinalados os diferentes tratamentos possíveis (Fernandes, 2015). Os principais tratamentos possíveis de serem aplicados para o combate a esta praga são: injeção de baixa pressão (endoterapia) que pode ser combinada/aliada à aplicação via foliar de inseticidas sistémicos e de contacto bem como produtos biológicos como os NEPs (Neves *et al.*, 1999). Os tratamentos foliares são muito importantes pois eliminam os insetos alojados nas zonas localizadas mais externamente, como a folha. Contrariamente, os tratamentos fitossanitários mediante injeção são responsáveis por eliminar as larvas alojadas no interior da palmeira (Neves, 2010). Em ambos os casos, alternam-se

“Utilização de nemátodes entomopatogénicos para o controlo biológico de pragas agrícolas”

substâncias ativas para evitar resistências a estes produtos. O tratamento fitossanitário da praga do escaravelho pode ser ou curativo ou preventivo (Tabela 3).

Quadro 3. Principais tipos de tratamento fitossanitário realizados com NEPs

	Tratamento fitossanitário preventivo	Tratamento fitossanitário curativo
Época do tratamento	De novembro a fevereiro	Injeções e aplicações foliares em março, julho e setembro e aplicação de nemátodes de novembro a fevereiro.
Tratamento	Utilização de produtos químicos e biológicos (nemátodes). Devem ser aplicados nemátodes e de março a outubro, tratamentos foliares e por injeção (mensalmente).	Este tipo de tratamentos é mais indicado para palmeiras sem sintomas de ataque. No entanto, este tipo de tratamento é também indicado para palmeiras recuperadas, depois de ter sido aplicado o tratamento curativo.

Fonte: Adaptado de Avisos Agrícolas (2014)

Este tipo de medidas preventivas e curativas anteriormente enunciados na Tabela 3, comportam como se pode imaginar custos elevados devido à dimensão das espécies hospedeiras (palmeiras) e do local onde se encontram localizados, necessitando-se para o efeito de viaturas com plataforma elevatória dada a alturas dos exemplares normalmente afetados. Os gastos normalmente estimados para este tipo de tratamentos implicam as deslocações dos técnicos ao local afetado, custos com inseticidas (modo de proteção integrada), NEPs e água. A estimativa dos custos anteriormente referidos serão estimados consoante os preços do mercado existentes em Portugal, bem como os produtos fitofarmacêuticos mais utilizados para este fim, tendo sempre como base de comparação os NEPs.

2.3.1. Época do tratamento

Com o objetivo de preservar as palmeiras e controlar a praga, os tratamentos devem ser realizados mensalmente (de novembro a fevereiro são feitas as pulverizações com NEPs) e nos restantes meses é aplicado o inseticida, uma vez que para a eficácia do tratamento com NEP estes devem ser aplicados com temperaturas baixas e humidade para uma maximização de resultados. Para este caso em particular foi escolhido um produto à base de NEP (Fig. 19) para avaliação do custo da sua aplicação. O nome do tratamento com estes produtos é Palm Control 250 M e é comercializado pela empresa Biostasia Lda.



Figura 18. Produto à base de NEPs: Palm Control 250 M.

2.3.2. Palm Control 250M

O produto à base de nemátodes (da espécie *Steinernema Carpopapsae*) denominado *PalmControl Plus* é um produto biológico que pode ser utilizado para o controlo de diferentes pragas de insetos nomeadamente coleópteros, lepidópteros e dípteros, por exemplo. No entanto, este produto comercial anteriormente referido foi especialmente desenvolvido e tem vindo a ser aprimorado para o controlo da praga *Rhynchophorus ferrugineus* e *Paysandisia archon* principalmente em palmeiras.

A formulação deste produto é feita à base de quitosano, um produto natural derivado da quitina que além de orgânico é biodegradável, não-tóxico e não-contaminante. O quitosano também é utilizado no setor agrícola como fortificante e indutor de mecanismos de defesa das plantas. O quitosano provoca vários efeitos nas plantas tais como: aumento do produção da colheita, desenvolvimento equilibrado do sistema aéreo e radicular e aumento significativo da resistência e do grau de lenhificação das plantas, tornando-as menos suscetíveis a condições de stress e possíveis ataques de insetos e fungos. Para além

das características anteriormente enunciadas, o quitosano é também responsável pela proteção dos nemátodes frente a condições ambientais adversas, tais como altas temperaturas, seca e raios UV uma vez que tem uma capacidade de formar filme envolvente (Biostasia, s/d).

2.3.2.1. Modo de ação do Palm Control 250M

Primeiramente, os NEPs matam e eliminam eficazmente a praga. A bactéria que levam associada na sua constituição começa a libertar uma série de metabolitos quitinoíticos tais como enzimas e antibióticos, durante o processo de infeção do inseto.

No caso de mecanismo de ação sem quitosano, o tubo germinativo de um fungo pode facilmente penetrar a parede celular produzindo uma lesão ou morte celular. No caso de tratamento com quitosano, este deposita-se nas zonas com recetores patogénicos das plantas.

Esta ação quimiolítica através das enzimas libertadas pela bactéria faz com que o processo de assimilação do quitosano por parte da planta seja feito de forma mais rápida e eficaz, uma vez que a forma de atuação destas enzimas é através do rompimento dos polímeros de quitosano em moléculas (monómeros e dímeros de açucares N-acetilados) que são mais facilmente assimilados pela planta, chegando facilmente aos insetos.

As células atuam como se um organismo patogénico tivesse alcançado essas zonas, enviando informação ao núcleo, estimulando as respostas de defesa da planta (parecido ao mecanismo de uma vacina). Algumas das respostas incluem a fortificação da parede celular, protege a célula quando os patógenos chegam às zonas recetoras, evitando a sua penetração da célula (Fig.20).

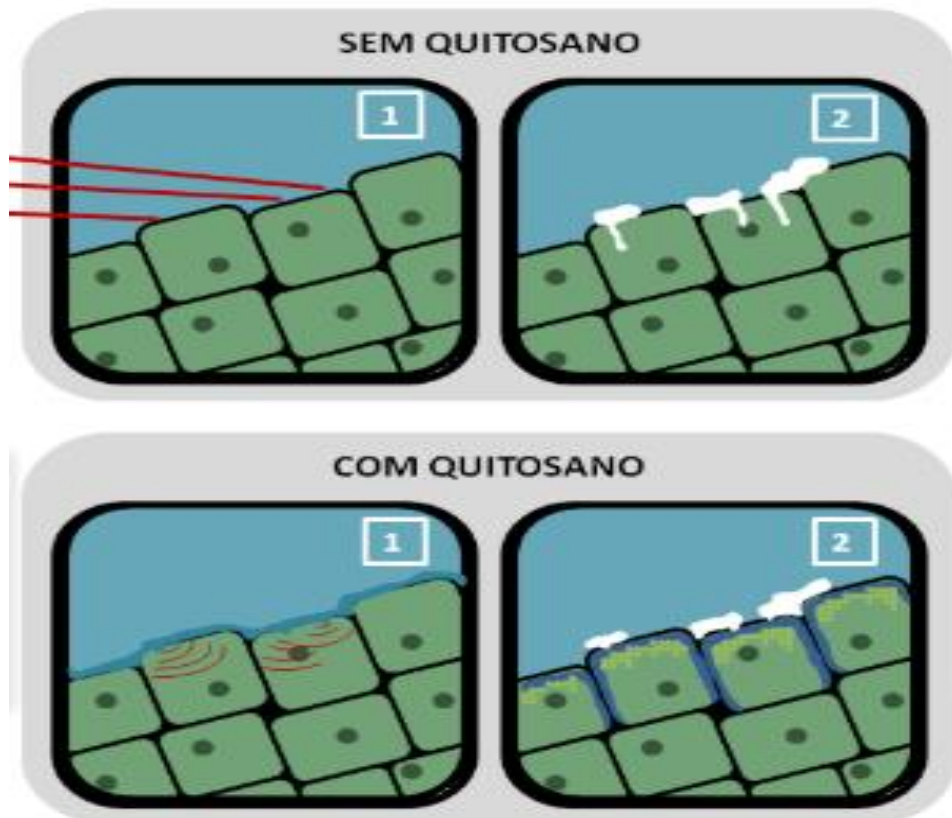


Figura 19. Mecanismos de atuação na eliminação da praga (A) sem quitosano; (B) com quitosano nas

Fonte: Biostasia,

http://www.biostasia.com/DETALHE_PRODUTO_BIOSTASIA.aspx?ID_Content=103

Devido à capacidade do quitosano formar um filme, os nemátodes ficam cobertos por uma película protetora que os ajuda mais facilmente a sobreviver quando estes estão perante condições adversas tais como altas temperaturas, seca e raios UV. Para além disso, devido à atividade fungicida do quitosano leva a uma inibição da proliferação de possíveis microrganismos patogénicos facultativos que podem causar prejuízos significativos nas plantas.

As épocas do ano para os tratamentos com Palm Control 250M estão explicadas na tabela 4.

Quadro 4. Principal época do ano e principais tratamentos a realizar com nemátodes entomopatogénicos e inseticidas

Época do ano	Palmeiras sem sintomas	Palmeira com sintomas leves ou pouco infestadas (em recuperação)
inverno (nov-fev)	nemátodes entomopatogénicos	nemátodes entomopatogénicos *
março a outubro	Tratamentos preventivos (intervalados de 30-40 dias)	Tratamentos curativos (intervalados de 30-40 dias)
Inverno		Poda sanitária

(*) Na luta biológica os nemátodes patogénicos das espécies *Steinema feltiae* sp.e *Heterorhabditis bacteriophora*, assim como o quitosano – *N-acetilglucosamina* mostraram efeitos satisfatórios no controlo da praga.

Fonte: Adaptado de Avisos Agrícolas (2014)

2.4. Estimativa de custos dos tratamentos nas árvores afetadas

Para efeitos de comparação e cálculo do preço, serão comparados inseticidas utilizados em Proteção Integrada (Confindor S.A. e Actara ®) e um produto à base de NEPs (*Steinema feltiae* sp. e *heterorhabditis bacteriophora*) usados em Agricultura Biológica comercializado pela Biostasia Lda.. Serão considerados para o cálculo final de custo, 100 palmeiras afetadas com a praga às quais é necessário ser efetuado tratamento. Alguns dos dados relativos aos custos dos inseticidas bem como custo da água tiveram como base os resultados obtidos no projeto final de Licenciatura elaborado por João Pinto Fernandes, “Escaravelho-das-Palmeiras – Combate à Destruição do Património Paisagístico de Cascais” (Fernandes, 2015).

2.4.1. Ações de tratamento preventivas e curativas

As ações de tratamento, preventivas e curativas, para este tipo de pragas são normalmente da responsabilidade de entidades criadas para o efeito, nomeadamente organismos ambientais bem como divisões regionais para a gestão dos espaços verdes.

Por essa razão, a análise dos custos dos tratamentos irá abordar apenas os gastos referentes aos tratamentos por pulverização, uma vez que custos inerentes a podas sanitárias

efetuadas no Inverno para controlo da praga possuem custos que nesta hipotética situação não é possível estimar. Dada a altura deste tipo de espécies (entre 10 a 20 m) assim como a sua localização principalmente em parques de estacionamento, passeios públicos e arruamentos, é essencial que sejam utilizados alguns meios técnicos e humanos tais como, plataforma elevatória, pulverizadores, camião cisterna de água de bombeiros e elementos de polícia para garantir a realização deste tipo de trabalhos em segurança e que comportam como é evidente custos elevados (Fig. 21).



Figura 20. Tratamento das palmeiras atacadas pela praga-do-escaravelho.

Fonte: Fernandes (2015)

Considerando o tratamento por pulverização e utilizando um pulverizador de alto débito (Fig. 22), deve-se ter sempre em mente que este deve ser efetuado ao longo do ano principalmente em duas épocas distintas: no inverno para os NEPs e no verão para as inseticidas com uma periodicidade de 30 a 45 dias (Fernandes, 2015).

Com vista a uma maximização de resultados e otimização da eficácia, deve-se ter em conta uma maior frequência dos tratamentos bem como, sempre que possível realizar tratamentos preventivos para dessa forma controlar melhor a praga e evitar estragos. Por essa razão, será feita uma estimativa de custos optando pela realização de tratamentos mensais num total de doze por ano. Assim, estima-se que nos meses de novembro a fevereiro serão realizadas as pulverizações com NEPs Palm Control 250 M da Biostasia (4 tratamentos), e nos restantes meses, são efetuados oito tratamentos recorrendo à aplicação de inseticida, aproveitando o facto de que os NEPs devem ser aplicados com temperaturas baixas e humidades elevadas para melhores resultados.



Figura 21. Pulverizador de alto débito para aplicação dos produtos à base de NEP e inseticidas

Fonte: Agropointm https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRgU1M9ivY5dMUSsD9pRtBgRZKGNWL4iLRHrMeTYrXzE-9sVU_L

Para efeitos de cálculo da dosagem para o tratamento foliar (pulverização), são indicadas na Tabela 5 as dosagens necessárias para proceder ao encharcamento do meristema apical das 100 palmeiras “hipotéticas” que se supõe que estejam infetadas com a praga do escaravelho.

Quadro 5. Dosagens para o Tratamento Foliar, através de pulverização.

Dosagens para o Tratamento foliar - Pulverização				
		Proteção integrada		Nemátodes entomopatogénicos (milhões)
Número de palmeiras	Água(L)	Inseticida Confinador (L)	Inseticida Actara (Kg)	Palm Control 250 M (milhões)
1	30L	0,03	0,012	50
100	3000L	3	1,2	5000

Fonte: Adaptado de Fernandes (2015)

“Utilização de nemátodes entomopatogénicos para o controlo biológico de pragas agrícolas”

Para determinar os custos por tratamento foliar (Quadro 6), considerou-se um custo da água por m³ de 0,02€ determinado por uma entidade reguladora da região onde as palmeiras estão localizadas e 100 palmeiras que necessitam de serem tratadas.

Quadro 6. Estimativa de custos, por tratamento foliar, para controlo do escaravelho-da-plameira, através de pulverização de palmeiras

Custos por tratamento foliar –pulverização (por cada mês de tratamento)				
		Proteção integrada		Nemátodes entomopatogénicos (milhões)
Número de palmeiras	Água(L)	Inseticida Confindor (L)	Inseticida Actara (Kg)	Palm Control 250 M (milhões)
1	0,02€	4,44€ ⁽¹²⁾	4,44€ ⁽¹²⁾	35,62€
100	2€	444€	444€	3562€

Fonte: Projeto Final de Licenciatura: “Escaravelho das Palmeiras – Combate à Destruição do Património Paisagístico de Cascais” disponível em: <https://repositorio-cientifico.ualantica.pt/bitstream/10884/959/1/Vers%C3%A3o%20UATLA%20%20do%20Projeto%20final%20-%20Escaravelho%20das%20Palmeiras%20em%20Cascais%20%28Jo%C3%A3o%20Pinto%20-%20GAT-%2020121660%29.pdf>

O custo para as hipotéticas 100 palmeiras inseridas nas zonas mais vulneráveis da região por tratamento foliar, relativamente ao inseticida/água compreende valores na ordem dos 446€ €/mês consoante o inseticida a aplicar e para os nemátodes/água valores de 3564 € por mês.

Já quando se analisa o custo deste tipo de tratamentos enumerados acima para um ano de tratamento, ou seja, oito tratamentos com inseticida e quatro tratamentos com produtos à base de NEP verifica-se que as 100 palmeiras compreendem um custo de tratamento na ordem dos 14238€ anuais (produtos à base de NEP) o que se revela um custo anual superior quando comparado com os produtos à base de inseticidas (3552€) (Quadro 7).

Quadro 7. Custos anuais do tratamento foliar, através de pulverização de palmeiras

Custos por tratamento foliar – pulverização (anual)				
		Proteção integrada		Nemátodes entomopatogénicos (milhões)
Número de palmeiras	Água(L)	Inseticida Confindor (L)	Inseticida Actara (Kg)	Palma Contro 250 M (milhões)
1	0,02€	4,44*8=35,52€ ⁽¹³⁾	4,44*8=35,52€ ⁽¹³⁾	35,62*4=142,48€ ⁽¹⁴⁾
100	2€	444*8=3552€	444*8=3552€	3562*4=14248€

Fonte: Projeto Final de Licenciatura: “Escaravelho das Palmeiras – Combate à Destruição do Património Paisagístico de Cascais” disponível em: <https://repositorio-cientifico.uatlantica.pt/bitstream/10884/959/1/Vers%C3%A3o%20UATLA%20do%20Projeto%20final%20-%20Escaravelho%20das%20Palmeiras%20em%20Cascais%20%28Jo%C3%A3o%20Pinto%20-%20GAT-%2020121660%29.pdf>

Para chegarmos a uma conclusão sobre os custos de cada tratamento, bem como qual o tratamento que iremos adotar temos de ter em consideração os valores de investimentos em material tais como um pulverizador de alto débito, bem como todos os procedimentos de segurança que devem ser adotados, para que o tratamento seja feito em segurança, assim como os valores mensais e anuais inerentes à realização deste tipo de trabalhos.

Atendendo ao valor comercial deste tipo de exemplares de espécies vegetais como as palmeiras e dado a estimativa de custos para os tratamentos mensais e anuais curativos das eventuais 100 palmeiras afetadas, é possível concluir que uma atitude preventiva por parte das entidades responsáveis pela manutenção deste tipo de exemplares é a melhor opção quando comparada com uma atitude curativa, que comporta custos bastante superiores.

Os tratamentos à base de pulverizações, visam sobretudo atacar as diferentes fases do escaravelho que ataca as palmeiras (Fernandes, 2015), conferindo-lhe maior estabilidade e facilidade na diluição dos inseticidas, permitindo fortificar o estado fitossanitário da palmeira assim como protegendo-o das possíveis pragas como por exemplo o escaravelho.

Analisando todos os custos inerentes a este tipo de tratamentos, conclui-se que a melhor atitude é a aposta na prevenção e seleção adequada dos exemplares de palmeiras, para minimizar custos com tratamentos curativos.

Uma atitude preventiva é fundamental para minimizar danos futuros e previne o aparecimento de pragas. No entanto, caso não haja outra hipótese, e se tenha efetivamente de optar pelo tratamento curativo devido ao estado de degradação que os exemplares se encontram, a escolha de produtos à base de NEPs é efetivamente muito mais cara.

No entanto, e consoante os objetivos das entidades competentes, pode ser a melhor opção tendo a conta a sustentabilidade do setor agrícola e a segurança de todos os habitantes da região, uma vez que se trata de produtos autorizados na Agricultura Biológica e que são à partida mais *eco-friendly*.

2.5. Caso de Estudo 2 - Controlo de pragas da horta por nemátodes entomopatogénicos

Os principais problemas encontrados em hortas e jardins estão relacionados com a presença de pulgões, moscas brancas, cochonilhas (insetos sugadores), entre outros tipos de insetos (Morando, 2009) (Fig.22).

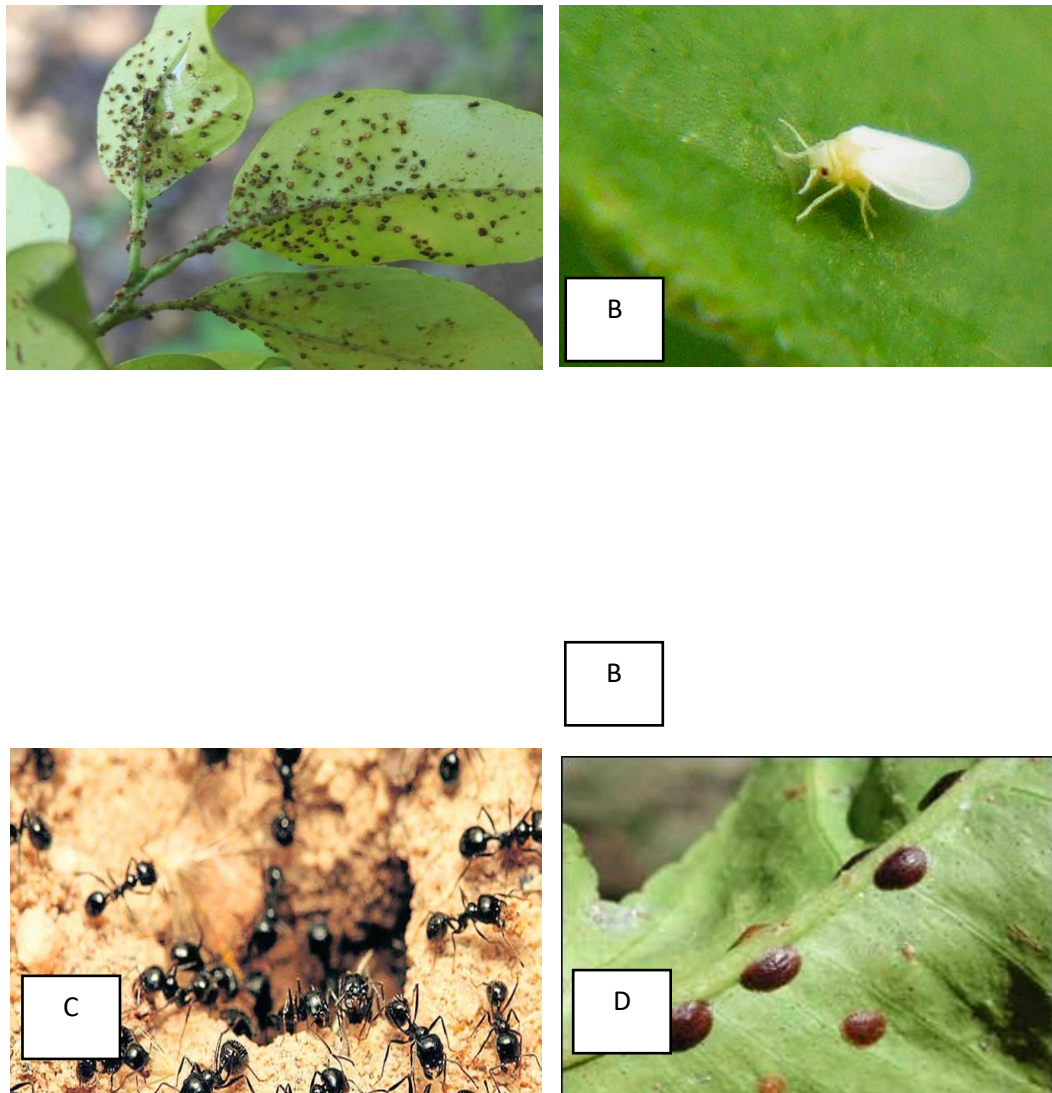


Figura 22. (A): pulgões; (B): mosca branca; (C): formigas; (D): cochonilhas

Fonte: adaptado de (Biostasia, s.d.)

Para minimizar questões relacionadas com este tipo de problemas, a gestão da fertilidade do solo pode ser fundamental, uma vez que as plantas que se encontram com uma melhor nutrição são muito menos suscetíveis a possíveis pragas que podem aparecer (Morando, 2009).

O tratamento da horta com recurso a NEPs permite preparar a terra, no início da época, e futuramente proteger o solo ao eliminar inimigos indesejáveis tais como formigas, larvas de nóctuas bem como outros parasitas referidos anteriormente.

Reforce-se a ideia de que a utilização de NEP para controlo das pragas da horta simboliza uma solução eficaz e mais sustentável de luta biológica para exterminar as larvas destes parasitas que provocam danos apreciáveis na horta ou jardim (Morando, 2009).

2.5.1. Nemátodes contra as pragas da horta da marca Presto Bio

As características como o modo de ação, modo de aplicação, período de tratamento entre outros) deste produto biológico contra as pragas da horta são descritas no Quadro 8.

Quadro 8. Principais características dos NEPs usados contra pragas da horta da marca Presto Bio

MODO DE AÇÃO	Tratamento contra as formigas, ralos, larvas de nóctuas, de típulas e outros parasitas.												
PROTEÇÃO CONTRA CULTURAS	Legumes da horta												
MODO DE ADMINISTRAÇÃO	O tratamento com recurso a nemátodes pode ser efetuado de maneira preventiva ou curativa, assim que a praga apareça e a temperatura atinja 10 a 12°C.												
MODO DE ACONDICIONAMENTO	Pó fino em saqueta.												
MODO DE APLICAÇÃO	Através de uma simples rega. Humedecer a terra que se pretende tratar. Deitar o pó num regador, adicionar água e misturar bem. Regar a terra. O tratamento tem uma eficácia de ação de várias semanas.												
PERÍODO DE TRATAMENTO	Verde: período ideal de tratamento Temperatura superior a 10-12°C <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>J</td><td>F</td><td>M</td><td>A</td><td>M</td><td>J</td><td>J</td><td>A</td><td>S</td><td>O</td><td>N</td><td>D</td> </tr> </table>	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D		
DOSAGEM / SUPERFÍCIE TRATADA	33 milhões de nemátodes para 20m ² 6 milhões de nemátodes para 40m ² .												

Fonte: Presto Bio disponível em: <http://www.prestobio.pt/nematodos-contras-as-pragas-da-horta->

2.5.2. Tratamentos preventivos e curativos

Para efeitos de comparação e cálculo do preço, será comparado um inseticida muito utilizado para controlo deste tipo de pragas: Decis 25EC (Fig. 24) e Lutabio (Fig. 25), ambos os produtos à base de NEPs usados em Agricultura Biológica comercializado pela Presto Bio. Serão considerados para o cálculo final de custo, áreas de tratamento com dimensões de 100m² e 1000m².



Figura 23. Imagem ilustrativa do produto Decis 25EC, um inseticida para controlo deste tipo de pragas



Figura 24. Imagem ilustrativa do produto Lutabio, um inseticida biológico

Para efeitos de cálculo da dosagem dos produtos anteriormente referidos como possibilidade de tratamento, são indicadas no Quadro 9 as dosagens necessárias para proceder ao tratamento hipotético de uma área de 100 m² e 1000m² respetivamente.

Quadro 9. Dosagens para o tratamento das pragas da horta, através de pulverização

Pulverização			
		Proteção integrada	Nemátodes entomopatogénicos (milhões)
Área a tratar (m ²)	Água(L)	Decis(Bayer)(L)	Lutabio
100m ²	100	0,003	15M (são necessárias 2,5 embalagens de 1.25 mL)
10000m ²	10000	0,3L	150M (são necessárias 25 embalagens de 12 mL)

Fonte: Loja Agropecuária.pt disponível em: <http://www.lojaagropecuaria.pt/196-000428>; Presto Bio disponível em: <http://www.prestobio.pt/nematodos-contras-pragas-da-horta->

Para determinar os custos por tratamento mensal (Quadro 10) considerou-se um custo da água por m³ de 0,02€ tal como no caso de estudo 1, e o preço dos produtos de mercado atualmente praticados por este tipo de mercado.

Quadro 10. Custo por tratamento mensal do Decis S.A. e Lutabio, para as pragas agrícolas

Custos por tratamento			
		Proteção integrada	Nemátodes entomopatogénicos (milhões)
Área a tratar (m ²)	Água(L)	Decis(Bayer)(L)	Lutabio
100m ²	0,06 €	0,21€ ⁽¹⁵⁾	3*14,99=44,97€ ⁽¹⁷⁾
10000m ²	6€	21€	25*14,99=374,75

Fonte: Loja Agropecuária.pt disponível em: <http://www.lojaagropecuaria.pt/196-000428>

Site da loja AKI disponível em: <https://www.aki.pt/Nematodocontrapragasdahorta-P60218.aspx>

O cálculo do custo dos tratamentos anual no caso das pragas da horta não faz sentido uma vez que este tipo de culturas não tem ciclo da cultura anual, caracterizando-se por serem culturas sazonais ou de época com curto período de crescimento e desenvolvimentos, pelo que os tratamentos devem ser pontuais consoante o nível de ataque.

Tal como se verificou no caso 1, os tratamentos à base de NEPs são muito mais dispendiosos do que os praticados pelo mercado dos inseticidas como o Decis25EC.

No entanto, os produtos biológicos da horta são bastante mais valorizados em termos de preço pago ao produtor do que o mercado da agricultura convencional, pelo que pode compensar o investimento nestes métodos de proteção mais sustentáveis. Cabe ao produtor agrícola perceber em que mercado quer atuar, e qual a margem de lucro para cada tipo que deseja obter.

Além do produto à base de nemátodes da marca presto Bio utilizado para combater as pragas da horta, existem atualmente no mercado deste tipo de produtos outras alternativas (Quadro 11).

Quadro 11. Lista de produtos, com NEPs, disponíveis em Portugal para o combate das pragas da horta

Nome comercial do produto	Empresa que comercializa	Culturas	Formulação	Dose	Intervalo de segurança
FLOCTER 	BAYER	Pepino Melancia Pimenteiro Beringela Tomateiro Meloeiro <i>Courgette</i>	Pó molhável	4080 kg/ha	Não tem
OXAMYL SAPEC 10L 	SAPEC	Beringela Pepino Pimenteiro Tomateiro	Solução concentrada	10L/ha	21 dias
OXAMYL	SELECTIS	Tomateiro Beringela Courgette Pimenteiro	Solução concentrada	10L/ha	_____
VAPO SOLO 510 VAPO SOLO® 510 	NUFARM	Cenoura Tomateiro	Solução concentrada	300L/ha	Não tem

3. Conclusões

Neste trabalho, foram estudados produtos diferentes à base de NEPs disponíveis para o combate a dois tipos de pragas: o escaravelho-da-palmeira e pragas da horta. Para o tratamento do escaravelho-da-palmeira foi analisado Palm Control 250 M (da Biostasia, Lda.); e para as pragas da horta, Decis 25EC e Lutabio (ambas da Presto Bio S.A.). O objetivo deste estudo foi comparar os custos e eficácia destes produtos com inseticidas e sensibilizar para a utilização de produtos de tratamento fitossanitário mais *eco-friendly*, pois será garantido uma maior sustentabilidade do setor agrícola.

Quanto à praga do escaravelho-da-palmeira, o biopesticida Palm Control 250M revela-se eficaz como atitude preventiva, ou seja, aplicar antes da palmeira estar infetada. Os tratamentos realizados através de pulverizações visam sobretudo conferir maior estabilidade e a fortificar o estado fitossanitário da palmeira. No entanto, num estado de degradação mais avançado, a escolha de produtos à base de NEPs é efetivamente muito mais cara.

Quanto às pragas da horta (pulgões, moscas brancas, cochonilhas, lagartas, caracóis, entre outros), o tratamento da horta com recurso a NEPs permite preparar a terra, no início da época, e futuramente proteger o solo ao eliminar estas pragas. No entanto, tal como se verificou para a praga do escaravelho-da-palmeira, este tratamento é muito mais caro do que os pesticidas. No entanto, os produtos biológicos da horta são bastante mais valorizados do que o mercado da agricultura convencional, pelo que pode compensar o investimento nestes métodos de proteção mais sustentáveis.

A sustentabilidade agrícola implica, necessariamente, a resolução dos problemas relacionados com o controlo de doenças e pragas. Porém, diversas técnicas utilizadas para minimizar os danos ocasionados por esses problemas contaminam o ambiente. A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com pesticidas deu origem à pesquisa de métodos naturais e seguros para a eventual substituição de pesticidas químicos. Estes métodos *eco-friendly* conduzem a um maior equilíbrio do agroecossistema e a longo prazo, acaba por ser a melhor opção para o agricultor ao nível da prevenção e cura de pragas.

4. Bibliografia

Aguiar, S. & Joaquim, H. (2014). *Alternativas Biológicas para o Combate de Pragas Agrícolas*. MUSAMI – Operações Municipais do Ambiente, EIM, SA.

Almenara, D., Neves, M., Kamitani, F. & Winter, C. (2010). Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. *Revista da Biologia*, 6b, 1-6.

Almenara, D., Rossi, C., Neves, M. & Winter, C. (2012). Nematoides Entomopatogênicos. *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular*, 1-40.

Avisos Agrícolas (2014). *Estação de Avisos de Castelo Branco: Circular n19/2014*. Castelo Branco.

Barbosa, C. (2005). *Técnicas de produção in vivo de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) em Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos*. Brasil, Minas Gerais.

Biostasia (s/d). *Projectos e Serviços de Engenharia Lda.*. Disponível em: https://issuu.com/maria_agns/docs/catalogo_1.0
[Acedido em 2018].

Biostasia (s/d). *Nematodos entomopatogênicos: uma solução eficaz para pragas hortícolas e ornamentais*.

Blaxter, M. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.

Brida, A. (2015). *Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e influência da temperatura e do substrato na sobrevivência, multiplicação e armazenamento*. Tese de Doutorado em Agronomia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”: Faculdade de Ciências Agrônômicas.

Brida, A. (2018). *Situação atual e perspectiva do emprego de NEPs no manejo de insectos praga*. XXXV Congresso Brasileiro de Nematologia.

Brooks, A. & Haltstead, A. (2010). *Pragas e doenças das plantas* (4.^a ed.). Lisboa: Publicações Europa-América.

Coutinho, A., Sousa, A., Costa, M., Cordeiro, P., Ferreira, T. & Oliveira, T. (2010). *Produção de Biopesticidas*. Universidade do Porto: FEUP.

Duarte, R., Gonçalves, K., Espinosa, D., Moreira, L., De Bertoli, S., Humber, R. & Polanczyj, R. (2016). Potential of Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) and Compatibility With Chemical Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 109 (2), 594–601.

Ehlers, R.-U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (5 e 6), 623-633.

Fernandes, J. (2015). *Escaravelho das Palmeiras – Combate à Destruição do Património Paisagístico de Cascais*. Barcarena.

Gaugler, R. (2018). *Nematodes (Rhabditida: Steinernematida & Heterorhabditidae)*.

Disponível em:

Disponível em :

<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html>

Grewal, P. (2000). Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science*, 56, 401-406.

Grewal, P., Ehlers, R. & Shapiro-Ilan (2005). *Nematodes as Biocontrol Agents*. Nova Iorque: CABI.

Han, R. & Ehlers, R. (2001). Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3), 239-247.

Hu, M., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Li, S., Xu, H., Zheng, Y. (2015). Determination of ametoctradin residue in fruits and vegetables by modified quick, easy, cheap, effective,

rugged, and safe method using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 175 (15), 395-400.

Hugot, J.-P., Aujard, P. & Moran, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3(3), 199-208.

Jadoski, S., Satio, L., Prado, C., Lopes, E. & Sales, L. (2010). Características da lixiviação de nitrato em áreas de agricultura intensiva. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* 3(1), 193-200.

Khan, M. & Damalas, C. (2015). Factors preventing the adoption of alternatives to chemical pest control among Pakistani cotton farmers. *International Journal of Pest Management* 6, 9-16.

Leite, L. G. (2016). *Nematoídes entomopatogênicos: avanços e desafios para a produção e uso*. São Paulo: Instituto Biológico.

Machado, B. (2018). *Controle da podridão azeda em frutos cítricos através de métodos alternativos*. Dissertação de Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal de São Carlos: Centro de Ciências Agrárias.

Martins, M. (2015). *Avaliação da resistência de linhagens de Feijoeiro ao Nemátode *Meloidogyne javanica* e ao Fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli**. Dissertação de Mestrado em Agricultura Biológica. Viana do Castelo: Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

Martins, J. & Fernandes, R. (2017). Processos de degradação do solo – medidas de prevenção. *Vida Rural*, 34-36.

Molina-Alcaide, E., Romero-Huelva, M. & Carro, M. (2017). Chemical composition and in vitro ruminal fermentation of waste fruits from horticulture. *XVII Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza, España.

Morando, R. (2009). *Preparo de extratos de plantas insecticidas como forma de incentivo na utilização preventiva do controle de pragas em horta*. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul: Unidade Universitária de Cassilândia.

Negrisoli, A., Negrisoli, C. & Silva, A., 2015. *Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos*. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Neves, J., Simões, N. & Mota, M. (1999). *Nemátodes Entomo patogénios: Uso e novas perspectivas*. *Boletim de Biotecnologia*, 23-29.

Neves, M. (2010). *Relatório e Proposta de medidas preventivas e de plano de acção sobre o "Escaravelho-da-palmeira"*. Cascais: Câmara Municipal de Cascais: s.n.

Neves, M., 2011. *Escaravelho-da-palmeira - Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)*, Cascais: DGEV - CMC.

Nicolau, P. (2016). *Microrganismo e ambiente: ar e água, solo e extremos*. Lisboa: Universidade Aberta.

Oliveira, G. (2017). *Tecnologias verdes: mecanismo de efetivação da política nacional de resíduos sólidos aplicada ao setor agrícola*. Dissertação de Mestrado em Direito Agrário. Universidade Federal de Goiás: Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Direito Agrário.

Panghal, A., Yadav, D., Khatkar, B., Sharma, H., Kumar, V. & Chhrikara, N. (2017). Post-harvest malpractices in fresh fruits and vegetables: food safety and health issues in India. *Nutrition & Food Science*, 48(4), 561-578. <https://doi.org/10.1108/NFS-09-2017-0181>.

Pretty, J. & Bharucha, Z. (2015). Integrated Pest Management for Sustainable Intensification of Agriculture in Asia and Africa. *Insects* 6(1), 152-182.

RitzingerI, C. H. S. P., FancelliI, M. & Ritzinger, R., 2010. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Dezembro, 32(4), 1289-1296.

Saxena, R. & Jenkins, D. (2014). Neem for sustainable pest management and environmental conservation. *Fiji Agricultural Journal* 54(1), 15-31.

Singh, A. & Upadhyay, V., 2018. A Review on Entomopathogenic Nematodes: Heterorhabditis and Steinernema. *Advances in Bioresearch*, 9(2), 214-222.

Stilwell, M. (2018). *Studying the Symbiotic Bacterium Xenorhabdus nematophila in Individual, Living Steinernema carpocapsae Nematodes Using Microfluidic Systems. mSphere.*

Sulistyanto, D., Ehlers, R.-U. & H.Simamora, B. (2018). Bioinsecticide Entomopathogenic Nematodes as Biological Control Agent for Sustainable Agriculture. *Tropical Agricultural Science*, 41(2), 907- 918.

Torres, L. (2011). *Entomopatogénios auxiliares das culturas*. Disponível em: <http://home.utad.pt/~ltorres/entomopatogenios.htm>
[Acedido em 2018].

Toubarro, D. (2010). Biopesticidas O Futuro do Controlo de Pragas? Açoriano Oriental. Disponível em: https://repositorio.uac.pt/bitstream/10400.3/1012/1/BIOLOGIA_28nov2010.pdf

Vashisth, S. (2013). Entomopathogenic Nematodes – A Review. *Agriculture Review*, 34, 163-175.

Vidal, M., Martins, I., Chambarelli, M. & Alves, V. (2018). Nematoides entomopatogénicos: agentes promissores no controle biológico de parasitos. In Trivilin et al. (2018), *Tópicos Especiais em Ciências Animal VII* (pp. 188-197). Porto Alegre-ES: CAUFES.