

Preparados homeopáticos sobre a atividade do fungo entomopatogênico

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae)

Homeopathic preparations on the activity of the entomopathogenic *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae)

DAMIN, Silvana^{1,2}; ALVES, Luis Francisco Angeli²; ALEXANDRE, Talita Moretto ^{2,3}; BONINI, Andreia Kusumota²; BONATO, Carlos Moacir⁴

1União Educacional de Cascavel, Cascavel/PR – Brasil, sil_dalmin@hotmail.com; 2Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Lab. de Biotecnologia Agrícola, Cascavel/PR - Brasil, luis.alves@unioeste.br; 3Programa Nacional de Pós-Doutorado/CAPES; 4Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular e Genética, Maringá/PR – Brasil, cmbonato@uem.br

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito in vitro dos preparados homeopáticos *Arsenicum album* 24 CH; *Calcarea carbonica* 30 CH; *Kali iodatum* 100 CH; *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 6, 30 e 100 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH; *Sulphur* 100 e 200 CH e *Thuya occidentalis* 200 CH sobre parâmetros biológicos do fungo *Beauveria bassiana*. Os homeopáticos em solução de água destilada e esterilizada (0,1%) foram pulverizados sobre o fungo previamente inoculado no meio de cultura BDA. Avaliaram-se a germinação, unidades formadoras de colônias (UFC), crescimento vegetativo, produção de conídios e atividade inseticida do fungo contra lagartas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 30 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH e *Thuya occidentalis* 200 CH reduziram significativamente a germinação de conídios. Com exceção de *Arsenicum album* 24 CH, os demais tratamentos promoveram aumento significativo de UFC. *Thuya occidentalis* 200 CH afetou a atividade inseticida do fungo, porém, todos os preparados homeopáticos foram classificados como compatíveis.

PALAVRAS-CHAVE: fungo entomopatogênico, medicamentos dinamizados, conservação de espécies, compatibilidade.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate in vitro effect of homeopathic *Arsenicum album* 24 CH; *Calcarea carbonica* 30 CH, *Kali iodatum* 100 CH; *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 6, 30 and 100 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH; *Sulphur* 100 and 200 CH and *Thuya occidentalis* 200 CH on biological parameters of the fungus *Beauveria bassiana*. The homeopathic solution in sterile distilled water (0.1%) was sprayed over the previously inoculated fungus on PDA culture medium. Germination, colony forming units (CFU), vegetative growth, conidial production and insecticidal activity of the fungus against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae were evaluated. *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH, *Staphysagria* 30 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH and *Thuya occidentalis* 200 CH significantly reduced conidial germination. All treatments promoted a significant increase in CFU, except *Arsenicum album* 24 CH. *Thuya occidentalis* 200 CH affected the insecticidal activity of the fungus although all homeopathic preparations were classified as compatible.

KEY WORDS: entomopathogenic fungus, dynamized drug, species conservation, compatibility.

Introdução

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. é um dos fungos entomopatogênicos mais conhecidos e estudados para o controle de pragas, sendo relatada sua ação para mais de 200 espécies de insetos e ácaros. No Brasil, é recomendado para o controle de mosca-branca (*Bemisia tabaci*), broca-da-erva-mate (*Hedypathes betulinus*), gorgulho-do-eucalipto (*Gonipterus scutellatus*), broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*), entre outros insetos (BRASIL, 2013). Sua ação está relacionada a genes específicos para síntese de proteases, quitinases e lipases, além de toxinas (XIAO et al., 2012).

Apesar da boa eficiência dos fungos em campo, as práticas culturais inadequadas vinculadas à aplicação de defensivos não seletivos a inimigos naturais prejudicam a persistência dos mesmos ou reduzem sua capacidade infectiva, sendo muitos produtos comerciais considerados tóxicos aos fungos entomopatogênicos (SOSA-GOMEZ et al., 2001, 2003).

Por outro lado, a demanda mundial por alimentos saudáveis e livres de substâncias tóxicas têm favorecido o uso de defensivos agrícolas naturais (DAN) para o controle de pragas e doenças, sendo uma alternativa menos danosa aos sistemas agrícolas como um todo, sobretudo naqueles de base orgânica e agroecológica. Tais produtos são caracterizados pela biodegradabilidade, seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade ambiental e animal, além de serem economicamente mais viáveis que os produtos fitossanitários sintéticos (PFS) (FERREIRA et al., 2001).

Dentre os DAN utilizados no manejo de pragas e doenças, além dos microrganismos entomopatogênicos, destacam-se as caldas fertiprotetoras, extratos vegetais, óleos essenciais e recentemente os preparados diluídos e

dinamizados (homeopáticos) (FERNANDES et al., 2008). A homeopatia revela-se como uma ferramenta tecnológica alternativa, com vasta aptidão para atender às exigências de uma agricultura sustentável, devido ao baixo custo dos produtos e impactos ambientais irrelevantes, conquistando gradativamente novos espaços (ROLIM et al., 2005a).

Estudos apontam para o potencial dos preparados homeopáticos para controle de insetos e ácaros (ALMEIDA et al., 2002; ROLIM et al., 2005a; RUPP et al., 2012). Da mesma forma, outros autores relatam controle de fitopatógenos (*Alternaria solani*, *Phakopsora euvitis* Ono); aumento na indução de resistência; produção de metabólitos secundários; desenvolvimento e produtividade de plantas; dentre outros aspectos (CASTRO, 2002; BONATO et al., 2006; TOLEDO, 2009; MODOLON, 2010).

A interação de DAN e fungos entomopatogênicos foi avaliada e, em alguns casos, houve efeito negativo sobre o fungo, como demonstraram Marques et al. (2004), que observaram redução da esporulação de *B. bassiana* na presença de óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.). Especificamente com relação aos homeopáticos, não há relatos sobre sua interação com fungos entomopatogênicos, contudo, estudos com fitopatógenos mostraram efeitos de algumas homeopatias na inibição da germinação de esporos do fungo *Fusarium roseum* (KHANNA & CHANDRA, 1976), diminuição do crescimento micelial e esporulação do fungo *A. solani* (TOLEDO, 2009; MODOLON, 2010).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de preparados homeopáticos atualmente utilizados para diversos fins agrícolas, sobre o fungo *B. bassiana*, no sentido de se conhecer o impacto destes medicamentos na biologia desse inimigo natural nos agroecossistemas.

Material e métodos

Produção de conídios de *Beauveria bassiana*

Utilizou-se o fungo *Beauveria bassiana* (isolado UNIOESTE 4), obtido da Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Unioeste, multiplicado em meio de cultura para produção de conídios ME (extrato de levedura 5 g, mistura de sais 4,6 g, glicose 10 g, ágar 20 g e água 1000 mL), incubados a 26 °C e 12h de fotofase, para crescimento e conidiogênese durante 8 dias. Os conídios foram coletados raspando-se a superfície do meio de cultura, transferidos para tubos estéreis de vidro, armazenado a -10 °C por período não superior a 10 dias, até a realização dos experimentos.

Obtenção e aplicação dos preparados homeopáticos

A seleção dos preparados homeopáticos a serem utilizados na agricultura, mais especificamente em vegetais, baseia-se principalmente em analogias com as matérias médicas comumente utilizadas na escolha das homeopias para humanos ou em resultados de trabalhos científicos. A escolha dos tratamentos de *Arsenicum album* 24 CH (Centesimal Hahnemanniana); *Calcarea carbonica* 30 CH; *Kali iodatum* 100 CH; *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 6, 30 e 100 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH; *Sulphur* 100 e 200 CH e *Thuja occidentalis* 200 CH foi baseada nos relatos dos efeitos destes medicamentos sobre diversas espécies vegetais, insetos e microrganismos (Tabela 1).

Os preparados homeopáticos e suas dinamizações correspondentes foram obtidas em laboratório farmacêutico homeopático, cujas preparações seguiram o preconizado pela Farmacopéia Homeopática Brasileira (BRASIL, 1997). Desta forma, 0,2 mL de cada um dos preparados homeopáticos foram adicionados separadamente em 19,8 mL (diluição 1/100) de álcool de cereais 70% e sucussionados 100 vezes

em dinamizador braço mecânico (Modelo Denise 50-Autic), obtendo-se a quarta dinamização homeopática (4CH). Na sequência e em diluições sucessivas foram obtidas as dinamizações subsequentes de cada preparado homeopático, as quais foram armazenadas para uso posterior.

Cada tratamento foi preparado adicionando-se em um tubo de vidro estéril 20 µL do preparado homeopático em 19,980 mL de água destilada e esterilizada (solução a 0,1% de concentração homeopático/água), sendo esses tratamentos em seguida pulverizados sobre o fungo, de acordo com cada parâmetro biológico.

Procedimentos gerais para avaliação *in vitro*

Utilizaram-se tubos de vidro estéreis contendo o fungo previamente produzido, nos quais foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada + Tween® 80 (0,01%). Esta suspensão foi agitada, quantificada em câmara de Neubauer e padronizada na concentração de 1×10^9 conídios mL⁻¹ e posteriores diluições, adequadas aos parâmetros avaliados.

Foram avaliados *in vitro* os seguintes parâmetros biológicos; germinação dos conídios, crescimento vegetativo, produção de conídios e atividade inseticida, de acordo com Silva e Neves (2005) e Oliveira (2009).

Germinação dos conídios

O meio BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, estreptomicina 0,05 g, ágar 15 g e 1000 mL de água destilada estéril) foi vertido em placa do tipo Rodac e após solidificação do meio BDA foram inoculados em sua superfície 150 µL da suspensão fúngica (1×10^6 conídios/mL), espalhada com a movimentação circular da placa de forma manual. Em seguida, 150 µL dos tratamentos foram aplicados com um micropulverizador acoplado a um compressor de ar (pressão constante de 0,84 kgf/cm² de saída). A testemunha água recebeu a

Tabela 1 - Produtos homeopáticos utilizados, dinamizações, modo de ação e indicação.

Homeopáticos	Dinamização	Modo de ação/ Indicação	Referências
<i>Arsenicum album</i>	24 CH	Produção de metabólicos secundários; controle de fitopatógenos; desintoxicação do solo e plantas	Casali et al. (2009); Bonato et al. (2012);
<i>Calcarea carbonica</i>	30 CH	Crescimento vegetativo em plantas; solo com deficiência de cálcio	Luis & Moreno (s/d); Bonato et al. (2012)
<i>Kali iodatum</i>	100 CH	Controle de fitopatógenos; desenvolvimento de plantas	Toledo (2009); Casali et al. (2009); Bonato et al. (2012)
<i>Phosphorus</i>	3 CH	Controle de fitopatógenos	Casali et al. (2009); Andrade (2000)
<i>Silicea</i>	30 CH	Controle de fitopatógenos e pragas; desenvolvimento vegetal	Bonato et al. (2006); Casali et al. (2009); Bonato et al. (2012)
<i>Staphysagria</i>	6; 30 e 100CH	Controle de insetos, ácaros e doenças fitopatogênicas	Rupp et al. (2012); Rolim et al. (2005a)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	30 CH	Controle de insetos	Almeida et al. (2003); Bonato et al. (2012)
<i>Sulphur</i>	100 e 200CH	Controle de fitopatógenos e pragas	Sinha & Singh (1983); Bonato et al. (2007); Casali et al. (2009)
<i>Thuya occidentalis</i>	200 CH	Controle de fitopatógenos, insetos e ácaros	Casali et al. (2009); Rolim et al. (2005a); Bonato et al. (2012)

pulverização de 150 μL de água destilada e esterilizada + Tween® 80 (0,01%). Para cada tratamento foram preparadas cinco placas, sendo cada uma correspondente a uma repetição.

Após a inoculação, as placas foram incubadas por 16 h a 26 ± 1 °C e 12 h de fotofase e então, contou-se o número de conídios germinados e não germinados em microscópio óptico (400 \times de aumento).

Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Foram inoculados e distribuídos 100 μL da suspensão do fungo (1×10^6 conídios/mL) sobre a superfície do meio de cultura BDA em placa de Petri. Em seguida, os tratamentos foram pulverizados conforme descrito no parâmetro germinação dos conídios. As placas testemunha contendo o fungo receberam 100 μL de água destilada e esterilizada + Tween® 80 (0,01%). As placas foram incubadas durante três dias a 26 ± 1 °C e 12 h de fotofase, com posterior quantificação das colônias formadas. Para todos os tratamentos foram preparadas cinco placas, sendo cada uma delas considerada uma repetição.

Crescimento vegetativo

O fungo foi inoculado na superfície do meio de cultura em placa de Petri, com auxílio de alça de platina em três pontos. As placas foram incubadas a 26 ± 1 °C e 12 h de fotofase por 2 dias. Após esse período, foram pulverizados 250 μL de tratamento/placa. A testemunha foi constituída de água destilada e esterilizada + Tween® 80 (0,01%). As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições, por mais cinco dias. O crescimento vegetativo foi determinado com base em duas medições perpendiculares das colônias, visando-se obter o seu diâmetro médio.

Produção de conídios

Após a verificação do crescimento vegetativo,

as colônias foram recortadas e transferidas individualmente para tubos de vidro estéreis, aos quais se adicionaram 10 mL de água destilada esterilizada + Tween® 80 (0,01%). Após agitação, por aproximadamente 2 minutos, fez-se a quantificação dos conídios em câmara de Neubauer e microscópio óptico. Para cada tratamento foram avaliadas 10 colônias, sendo duas de cada repetição.

Efeito de diferentes soluções hidroalcoólicas sobre os parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana*

Considerando que os produtos homeopáticos são constituídos por soluções alcoólicas, foi realizado um experimento com o objetivo de verificar o efeito deste solvente sobre parâmetros biológicos do fungo.

Foram adotados os procedimentos gerais para avaliação *in vitro* descritos anteriormente, tendo-se como tratamentos a pulverização de soluções hidroalcoólicas nas concentrações variando de 0,5 a 2,5% de álcool de cereais/água destilada e esterilizada. Os valores percentuais foram escolhidos com base na recomendação de que para preparo da “calda” aplicada em campo, não devem ser aplicadas soluções alcoólicas acima de 1%, visto a possibilidade de toxicidade para as plantas e agentes biológicos (BONATO et al., 2012). Na testemunha, aplicou-se água destilada e esterilizada. Para cada tratamento e também para a testemunha foram preparadas cinco repetições.

Efeito de diferentes preparados homeopáticos sobre parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana*

Foram adotados os mesmos procedimentos experimentais descritos no item procedimentos gerais para avaliação *in vitro*, tendo-se como tratamentos os preparados homeopáticos na concentração de 0,1% (Tabela 1). Foi também utilizada uma solução hidroalcoólica 0,1% não

dinamizada e uma testemunha, na qual se aplicou água destilada e esterilizada + Tween® 80 (0,01%).

Além dos parâmetros citados, avaliou-se o efeito dos preparados homeopáticos sobre a atividade inseticida de *B. bassiana*, conforme segue.

Avaliação sobre a atividade inseticida

O fungo foi inoculado em meio de cultura para esporulação (ME) e cerca de uma hora depois foram pulverizados os produtos na proporção de 250 µL sobre o fungo. Nas placas da testemunha, sobre o fungo inoculado foi aplicado 250 µL de água destilada e esterilizada. As placas foram incubadas por 8 dias a 26±1 °C e 12 h de fotofase. Os conídios foram coletados raspando-se a superfície do meio e transferidos para tubos de vidro estéreis, preparando-se em seguida, suspensões na concentração de 1×10⁹ conídios/mL com os conídios obtidos de cada um dos tratamentos. Esta concentração foi avaliada previamente para se obter aproximadamente 80% de mortalidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae).

Utilizaram-se nos bioensaios lagartas de 3^o ínstar de *D. saccharalis*, alimentadas com dieta artificial, provenientes da criação do laboratório.

Os insetos foram dispostos em placas de Petri e receberam 2 mL dos tratamentos utilizando-se torre de Potter (regulada à pressão de 1,05 kgf/cm²). Após 1 minuto, as lagartas foram transferidas para placas de Petri contendo dieta artificial, e foram incubados por 10 dias a 26± 1°C e 12 h de fotofase. Diariamente, era feita a substituição do alimento e avaliação de mortalidade, sendo os insetos mortos retirados, imersos em álcool 70% durante 15 segundos, seguida de imersão em água destilada esterilizada por igual tempo, e mantidos em câmara úmida para confirmação da mortalidade pelo fungo, observando-se sinais e sintomas de infecção pelo fungo. Para cada tratamento e

também para a testemunha foram utilizadas 60 lagartas divididas em repetições de 15 lagartas.

Análises dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados submetidos ao teste de normalidade (Shapiro Wilk) e análise de variância (teste F). As médias foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott, ambos a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar.

A compatibilidade entre os tratamentos e o fungo foi baseada no cálculo de toxicidade proposto por Rossi-Zalafet al. (2008):

$$IB = \frac{47[CV] + 43[ESP] + 10[GER]}{100}$$

em que: IB= Índice Biológico; CV= porcentagem do crescimento vegetativo da colônia após 7 dias, em relação à testemunha; ESP= porcentagem da esporulação das colônias após 7 dias, em relação à testemunha; GER= porcentagem de germinação dos conídios após 16 h, visto que os valores de CV, ESP e GER devem ser previamente corrigidos em relação às respectivas testemunhas. Os valores do IB (p=0,05) para a classificação dos produtos foram: Tóxico 0-41; Moderadamente Tóxico 42-66 e Compatível > 66.

Resultados e discussão

Efeito de diferentes soluções hidroalcoólicas sobre parâmetros biológicos de *Beauveria bassiana*.

Em geral, as diferentes soluções hidroalcoólicas não diferiram da testemunha água destilada nos parâmetros biológicos de *B. bassiana* (Tabela 2). A viabilidade em todos os tratamentos apresentou valores percentuais médios acima de 98,0%, significativamente iguais à testemunha (98,7%). Da mesma forma, as UFC também não foram afetadas.

Tabela 2 - Viabilidade de conídios, Unidades Formadoras de Colônias (UFC), crescimento vegetativo e produção de conídios de *Beauveria bassiana* (Unioeste 04), submetido a diferentes soluções hidroalcoólicas (26±1 °C e 12 h de fotofase).

Tratamentos	Viabilidade (%)	UFC	Crescimento Vegetativo (cm ²)	Produção conídios (× 10 ⁶ / mL)
Testemunha água	98,7 ± 0,55 a	83,2 ± 8,62 a	3,33 ± 0,13 a	16,6 ± 2,09 a
Sol. hidroalcoólica 0,5%	98,7 ± 0,24 a	87,4 ± 6,09 a	3,39 ± 0,07 a	14,0 ± 1,64 a
Sol. hidroalcoólica 1,0%	98,5 ± 0,78 a	97,8 ± 7,47 a	3,59 ± 0,07 a	20,9 ± 2,21 a
Sol. hidroalcoólica 1,5%	99,3 ± 0,46 a	85,2 ± 9,04 a	3,27 ± 0,19 a	20,3 ± 1,53 a
Sol. hidroalcoólica 2,0%	98,6 ± 0,94 a	79,2 ± 8,19 a	3,49 ± 0,15 a	17,4 ± 2,43 a
Sol. hidroalcoólica 2,5%	99,3 ± 0,41 a	74,0 ± 7,97 a	3,51 ± 0,09 a	18,7 ± 1,35 a
C.V. (%)	1,08	16,32	6,57	18,43
Fator F	0,70	1,71	1,46	2,96

Médias (± EP) seguidas de mesma letra na coluna, para cada graduação alcoólica testada, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Para o crescimento vegetativo, não houve diferença significativa entre o diâmetro das colônias obtidas nos tratamentos e também na comparação com a testemunha. A produção de conídios também não foi influenciada pela presença das soluções hidroalcoólicas, sendo que todos os tratamentos apresentaram-se significativamente iguais a testemunha. Ressalta-se que mesmo as soluções hidroalcoólicas com mais de o dobro de álcool das soluções homeopáticas, não apresentaram ação sobre parâmetros biológicos de *B. bassiana*.

Por outro lado, testes *in vitro* com o fungo *A. solani*, e soluções hidroalcoólicas dinamizadas, aplicadas na concentração de 0,0015% no meio de cultura, diferiram-se da testemunha água destilada (TOLEDO, 2009) nos diferentes parâmetros

biológicos do fungo avaliado. A variação observada na pesquisa citada com relação ao presente trabalho pode estar associada às espécies de fungo, e também ao processo de dinamização realizado pela autora para o preparo das soluções hidroalcoólicas, uma vez que houve efeito negativo, mesmo sendo utilizadas soluções com concentrações alcoólicas menores que no presente estudo. Embora o álcool seja considerado um veículo inerte pela farmacopeia homeopática, alguns experimentos feitos com solventes dinamizados, como a acetona apresentaram inibição no crescimento de plântulas de trigo (REIS et al., 2011) o que pode também interferir nos microrganismos em geral.

Entretanto, no presente estudo, pode-se descartar a possibilidade de o álcool

individualmente (não dinamizado) presente nos produtos homeopáticos intervir sobre o fungo (Tabela 2). Assim, os resultados significativos sobre os parâmetros biológicos de *B. bassiana*, provavelmente decorrem dos preparados homeopáticos propriamente ditos.

Ação das soluções homeopáticas sobre *Beauveria bassiana*.

Foram observados diferentes efeitos em *B. bassiana*, sendo que alguns parâmetros biológicos foram estimulados e outros inibidos na presença dos preparados homeopáticos (Tabela 3).

Para a viabilidade dos conídios, ocorreu redução significativa nos tratamentos *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 30 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH e *Thuya occidentalis* 200 CH. Os demais tratamentos apresentaram-se iguais a testemunha (Tabela 3).

De forma semelhante, Khanna e Chandra (1976) também relatam inibição da germinação de esporos do fungo *F. roseum* em tomates e de *Pestalotia mangifera* em frutos de manga, tratados com o homeopático *Phosphorus* nas dinamizações 35 e 50 CH, respectivamente.

No entanto, em estudos com *A. solani*, avaliando-se o efeito *in vitro*, não se verificou inibição na germinação do fungo tratado com as homeopatias *Sulphur*, *Silicea terra*, *Staphysagria*, *Phosphorus* e *Kali iodatum* nas dinamizações 6, 12, 30 e 100 CH (TOLEDO, 2009).

O processo de dinamização normalmente utilizado para preparo dos medicamentos e preparados homeopáticos transforma a matéria pelo aumento de seu poder de informação, sendo que cada dinamização age de uma forma única nos seres vivos, (BONATO et al., 2012). Assim, os distintos resultados observados por Toledo (2009), Khanna e Chandra (1976) e o presente trabalho, provavelmente ocorreram em virtude das diferentes dinamizações analisadas em cada

estudo, bem como em função das espécies de fungo envolvidas.

A pequena redução ou não interferência na viabilidade de *B. bassiana* com a maioria dos homeopáticos testados é de grande importância, já que é a partir da germinação que os fungos penetram no corpo do inseto e iniciam o processo de colonização, garantindo que ao menos o processo infeccioso se inicie (SILVA; NEVES, 2005).

Contrastando com a viabilidade, houve interação positiva sobre as UFC, de forma que apenas *Arsenicum album* 24 CH apresentou-se estatisticamente igual à testemunha água destilada. Os demais tratamentos, *Sulphur* 100 e 200 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 06, 30 e 100 CH; *Calcarea carbônica* 30 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH; *Thuya occidentalis* 200 CH; *Kali iodatum* 100 CH e *Phosphorus* 3CH promoveram aumento significativo de UFC comparado à testemunha. Assim, acredita-se que as homeopatias *Phosphorus* 3 CH; *Silicea* 30 CH; *Staphysagria* 30 CH; *Spodoptera frugiperda* 30 CH e *Thuya occidentalis* 200 CH possam ter apenas retardado a germinação dos conídios, visto que a viabilidade foi avaliada após 16 horas da aplicação e a formação de UFC se dá depois de 48 horas.

Especificamente em relação ao tratamento *Spodoptera frugiperda* 30 CH, com base nos princípios da homeopatia nessa dinamização a probabilidade de ser ter matéria da substância original em solução é remota, pois a partir da décima segunda diluição (1/100) ultrapassa-se o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$) restando apenas a informação da substância original (DAVENAS et al., 1988). Assim, sua ação positiva sobre o crescimento do fungo pode ter sido decorrente do estímulo da informação presente no preparado homeopático, já que é sabido *Spodoptera frugiperda* é suscetível a *B. bassiana* que no ciclo infeccioso se desenvolve

Tabela 3 - Viabilidade de conídios, Unidades Formadoras de Colônia (UFC), crescimento vegetativo, produção de conídios, valores de "T" e compatibilidade de *Beauveria bassiana* (Unioeste 04) submetido a diferentes preparados homeopáticos (26±1 °C e 12 h de fotofase).

Homeopáticos	Viabilidade (%)	UFC	Crescimento vegetativo (cm ²)	Produção conídios (× 10 ⁶ / mL)	Valor de T / C
Testemunha água	95,4 ± 1,23 a	31,2 ± 6,23 b	4,0 ± 0,23 b	47,5 ± 9,42 a	-
Sol. Hid. (0,1%)	95,7 ± 0,41 a	32,6 ± 2,43 b	4,2 ± 0,14 a	45,0 ± 4,45 a	-
<i>A. albus</i> 24CH	96,2 ± 0,78 a	40,2 ± 3,86 b	4,0 ± 0,08 b	42,1 ± 1,94 a	94,63/ C
<i>C. carbonica</i> 30CH	96,4 ± 0,53 a	51,8 ± 6,38 a	3,6 ± 0,37 b	41,4 ± 7,96 a	89,88/ C
<i>Kali iodatum</i> 100CH	93,8 ± 2,37 a	56,2 ± 6,86 a	4,0 ± 0,12 b	40,2 ± 8,47 a	92,87/ C
<i>Phosphorus</i> 3CH	90,6 ± 1,11 b	58,2 ± 8,67 a	4,4 ± 0,13 a	51,1 ± 5,86 a	107,13/ C
<i>Silicea</i> 30CH	90,6 ± 1,23 b	46,2 ± 4,75 a	3,9 ± 0,12 b	42,7 ± 6,48 a	87,60/ C
<i>Staphysagria</i> 6CH	94,1 ± 1,39 a	49,8 ± 2,09 a	3,6 ± 0,32 b	45,7 ± 5,27 a	92,47/ C
<i>Staphysagria</i> 30CH	90,4 ± 0,51 b	47,2 ± 2,62 a	4,3 ± 0,19 a	60,8 ± 9,32 a	114,69/ C
<i>Staphysagria</i> 100CH	94,0 ± 1,24 a	50,2 ± 3,25 a	4,1 ± 0,17 a	47,0 ± 11,11 a	100,33/ C
<i>S. frugiperda</i> 30CH	89,8 ± 0,86 b	54,2 ± 4,42 a	3,9 ± 0,05 b	38,9 ± 1,94 a	89,10/ C
<i>Sulphur</i> 100CH	95,2 ± 1,18 a	44,0 ± 3,48 a	4,1 ± 0,12 b	56,5 ± 5,97 a	108,56/ C
<i>Sulphur</i> 200CH	96,0 ± 1,44 a	51,6 ± 4,89 a	4,4 ± 0,08 a	46,8 ± 4,82 a	104,02/ C
<i>T. occidentalis</i> 200CH	89,7 ± 1,51 b	56,2 ± 9,93 a	3,8 ± 0,05 b	39,3 ± 8,83 a	89,71/ C
C.V. (%)	2,29	19,87	7,86	26,62	-
Fator F.	7,43	3,88	3,13	1,36	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott a 5% de significância.

Valores de T, segundo ROSSI-ZALAF *et al.* (2008) entre 0 e 41 = tóxico (T); entre 42 e 66 = Moderadamente tóxico (MT); maiores que 66 = compatível (C).

vegetativamente no hospedeiro (CARNEIRO et al., 2008).

De forma semelhante aos resultados observados nas UFC, os tratamentos homeopáticos não afetaram negativamente o crescimento vegetativo. De tal modo, que *Staphysagria* 30 e 100 CH; *Phosphorus* 3 CH e *Sulphur* 200 CH promoveram aumento no diâmetro das colônias de *B. bassiana*, diferindo-se da testemunha água destilada.

Estudos relacionados a fungos fitopatogênicos divergem do presente trabalho, já que testes com *Sulphur* 200 CH demonstram inibição em 100% do crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus* (SINHA; SINGH, 1983). Entretanto, deve-se considerar que a metodologia de preparação dos homeopáticos é extremamente diversa entre os países. Em consequência, os resultados podem divergir notoriamente dependendo da farmacopeia utilizada.

Em outros trabalhos, *Staphysagria* 30 CH e *Phosphorus* 30 CH reduziram a severidade de *A. solani* (ROLIM et al., 2005b). Assim como, *Staphysagria* 100 CH e *Sulphur* 100 CH inibiram o crescimento micelial desse fungo (redução de 12,87 e 16,97%) (TOLEDO, 2009). Já Modolon (2010) relata redução micelial de *A. solani* causada pelo homeopático *Arsenicum album* 80 CH. Tais resultados ainda corroboram a ação dos homeopáticos *Sulphur*, *Staphysagria*, *Arsenicum album* e *Phosphorus* no controle de doenças fitopatogênicas indicadas por Casali et al. (2009) e Bonato et al. (2012). No entanto, divergem do presente trabalho, sendo explicado pelo fato dos tratamentos utilizados pelos autores terem sido selecionados com base no princípio da “lei do semelhante” que rege a escolha das homeopantias (BELMUDE, 2001). Assim, as características de *A. solani* que se sobressaíram para escolha de cada tratamento, possivelmente condiziam com os sinais (sintomas) que esses produtos homeopáticos poderiam promover em *A. solani*, alcançando-se o

resultado de inibição do fitopatógeno. Neste trabalho, de forma distinta, os preparados homeopáticos foram escolhidos apenas com base no seu efeito observado por outros autores, como já mencionado.

Na produção de conídios não se observou diferença significativa em função das diferentes homeopantias utilizadas com relação à testemunha (Tabela 3). A ausência de efeito pode ter ocorrido pela especificidade dos homeopáticos, que por não terem uma ação generalizada sobre os fungos, não interferiram negativamente sobre os parâmetros biológicos de *B. bassiana*. Além disso, nas fases de colonização e esporulação, os fungos estão menos expostos aos produtos fitossanitários do que na fase de germinação (SILVA & NEVES, 2005).

Ainda com relação aos medicamentos *Sulphur*, *Silicea terra*, *Staphysagria*, *Phosphorus*, *Ferrum sulphuricum* e *Kali iodatum* nas dinamizações 6, 12, 30 e 100 CH, de forma geral, estes reduziram a esporulação do *A. solani*, com destaque para a homeopatia *Staphysagria* 6 CH (TOLEDO, 2009).

Ressalta-se que os estudos com homeopáticos em microrganismos, ainda estão limitados ao controle de fitopatógenos, dificultando a comparação de determinados parâmetros no presente trabalho.

Quanto à toxicidade, de acordo com o índice biológico proposto por Rossi-Zalafet al. (2008), conclui-se que todos os homeopáticos testados apresentaram-se compatíveis ao fungo *B. bassiana*, podendo ser recomendada sua utilização conjunta, visto que seu efeito sobre o fungo presente no ambiente pode ser mínimo, não afetando a conservação dos inimigos naturais.

Ação dos tratamentos homeopáticos na atividade inseticida de *Beauveria bassiana* sobre *Diatraea saccharalis*.

A mortalidade de *D. saccharalis* pelo fungo não foi afetada significativamente pela presença dos

preparados homeopáticos no meio de cultura, quando comparados os tratamentos contendo o fungo produzido no meio de cultura, tratado com água destilada apenas (testemunha fungo), com

exceção do tratamento *B. bassiana* + *Thuya occidentalis* 200 CH, que se diferiu da testemunha fungo (Tabela 4).

A não interferência da maioria dos tratamentos

Tabela 4 - Mortalidade confirmada (\pm EPM) de lagartas de *Diatraea saccharalis* submetidas ao fungo *Beauveria bassiana* (Unioeste 04), multiplicado em meio ME + produtos homeopáticos ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase).

Tratamento	Mortalidade média confirmada (%)
Testemunha água	$0,0 \pm 0,00$ c
Solução hidroalcoólica (0,1%)	$0,0 \pm 0,00$ c
<i>B. bassiana</i>	$86,7 \pm 5,44$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Thuya occidentalis</i> 200CH	$69,9 \pm 6,66$ b
<i>B. bassiana</i> + <i>Arsenicum album</i> 24CH	$93,3 \pm 5,44$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Calcarea carbônica</i> 30CH	$83,3 \pm 2,22$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>kali iodatum</i> 100CH	$85,0 \pm 7,28$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Phosphorus</i> 3CH	$91,7 \pm 1,92$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Silicea</i> 30CH	$85,0 \pm 3,68$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Staphysagria</i> 06CH	$79,9 \pm 5,44$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Staphysagria</i> 30CH	$86,5 \pm 5,37$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Staphysagria</i> 100CH	$83,3 \pm 6,66$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>S. frugiperda</i> 30CH	$85,0 \pm 3,68$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Sulphur</i> 100CH	$80,0 \pm 7,02$ a
<i>B. bassiana</i> + <i>Sulphur</i> 200CH	$86,0 \pm 3,14$ a
C.V.(%)	15,11

Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

homeopáticos sobre a atividade inseticida de *B. bassiana* pode ser justificada pela forma com que os homeopáticos agem, não sendo produtos que eliminam ou extinguem os organismos, mas sim utilizados para readaptar os seres vivos e suas funções ecológicas, de modo que seja restaurado o equilíbrio ao sistema (ALMEIDA et al., 2002).

Diante os resultados do presente trabalho, observando-se que todos os tratamentos homeopáticos apresentaram-se compatíveis ao fungo *B. bassiana* e não interferiram na atividade do mesmo sobre *Diatraea saccharalis*, acredita-se que o uso de produtos homeopáticos nos sistemas agroecológicos não interfira na conservação desses inimigos naturais, nem se descarta ainda a possibilidade de interações positivas entre produtos homeopáticos e fungos, no controle biológico aplicado. Isto porque, os testes *in vitro* expõem o patógeno à máxima atividade do produto e, se mesmo assim não houver interação negativa, espera-se que no campo (onde a exposição é menos intensa), seja provável também que não ocorram efeitos negativos (MOINO Jr. & ALVES, 1998). Contudo, estudos em condições reais devem ser conduzidos a fim de se confirmar a compatibilidade aqui constatada e se fazer a recomendação do uso seguro do ponto de vista ambiental.

Agradecimentos

A CAPES e CNPq por concessão de bolsas e financiamento de parte da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, M.A.Z. et al. Teor foliar de cobre durante o desenvolvimento do manjerico (*Ocimum basilicum* L.) intoxicado com sulfato de cobre e tratado com *Cuprum* CH30. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE HOMEOPATIA NA AGROPECUÁRIA ORGÂNICA, 3., 2002, Campinas do Sul, RS, **Anais...** Viçosa: UFV, 2002. p.91- 95.
- ANDRADE, F.M.C. Homeopatia no crescimento e produção de cumarina em cambá *Justicia pectoralis* Jacq. Viçosa, 2000. 124p.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- BELMUDE, J.R.M. **Organon da Arte de Curar**. São Paulo: Robe, 2001. 248p.
- BONATO, C.M. et al. Controle da ferrugem (*Phakopsora euvitidis* Ono) em videira pela aplicação de soluções homeopáticas. In: ENCONTRO DA CULTURA HOMEOPÁTICA, 16., Simpósio do GIRI, XX., 2006, São Paulo, SP. **Resumos...** São Paulo: GIRI 2006. p.52.
- BONATO, C.M. et al. **Homeopatia simples: alternativas para a agricultura familiar**. Marechal Cândido Rondon: Líder, 2012. 36p.
- BRASIL. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**. São Paulo: Atheneu, 1997. 118p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Consulta de produtos formulados/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília: MAPA, 2013. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 20 jun. 2013.
- CARNEIRO, A.A. et al. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.513-520, 2008.
- CASALI, V.W.D. et al. **Acologia de Altas Diluições**. Viçosa: Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, 2009. 537p.
- CASTRO, D.M. Preparações homeopáticas em plantas de cenoura, beterraba, campim-limão e cambá. Viçosa, 2002. 240p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa.
- DAVENAS, E. et al. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. **Nature**, Reino Unido, 1988; 333: 816.
- FERNANDES, M.C.A. et al. **Defensivos alternativos**. Niterói: Programa Rio Rural, 2008. 17p. (Documento Técnico 01). Disponível em: <<http://www.pesagro.rj.gov.br/downloads/riorural/01%20Defensivos%20Alternativos.pdf>>. Acesso: 20 jan. 2013.
- FERREIRA, J.T.B. et al. **Produtos Naturais no controle de Insetos**. São Carlos: UFSCar, 2001. 176p.
- KHANNA, K.K.; CHANDRA, S. Control of tomato fruit by *Fusarium roseum* with homeopathic drugs. **Indian Phytopathology**, India, v.29, p.269-272, 1976.
- LUIS, S.J.; MORENO, N.M. **Efecto de cinco medicamentos homeopáticos em laproducción de peso fresco, em cebollín**

- (*Allium fistulosum*). (S/D). Disponível em: <http://www.comenius.edu.mx/Cinco_medamentos_homeop_ticos_en_Ceboll_n.pdf>. Acesso em: 20 dez 2012.
- MARQUES, R.P. et al. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1675-1680, 2004.
- MODOLON, T.A. Preparados em altas diluições para o manejo fitossanitário e pós colheita do tomateiro. Lages, 2010. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina.
- MOINO Jr., A; ALVES, S.B. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.27, n.4, p.611-620, 1998.
- OLIVEIRA, D.G.P. Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável. Piracicaba, 2009. 90p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- REIS, B. et al. High dilutions of acetone affect the *Avena sativa* growth *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMÁCIA HOMEOPÁTICA, 8., Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu: International Journal of High Dilution, 2011. v.10 n.36, p.249-252.
- ROLIM, P.R.R. et al. Controle de ácaro vermelho do tomateiro por preparações homeopáticas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45., 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza, 2005a. 1 CD- Rom.
- ROLIM, P.R.R. et al. Preparados homeopáticos no controle da pinta preta do tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45., 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza, 2005b. 1 CD- Rom.
- ROSSI-ZALAF, L.S. et al. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças, In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba, FEALQ, 2008. p.279-302.
- RUPP, L.C.D. et al. High dilution of *Staphysagria* and fruit fly biotherapeutics preparations to manage South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, in organic peach orchards. **Biological Agriculture & Horticulture**, London, v.28, n.1, p.41-48, 2012.
- SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. and in vitro phytosanitary products. **Pest Management Science**, USA, v.61, p.667-674, 2005.
- SINHA, K.K. SINGH, P. Homeopathic drugs inhibitors of growth and aflotoxina production by *Aspergillus parasiticus*. **Indian Phytopathology**, India, v.36, p.356-357. 1983.
- SOSA-GOMEZ, D.R. et al. Natural Occurrence of the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in Soybean Under Till and No-till Cultivation Systems. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.3, p. 407-410, 2001.
- SOSA-GOMEZ, D.R. et al. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32, n.2, p.287-291, 2003.
- TOLEDO, M.V. Fungitoxicidade contra *Alternaria solani*, controle da pinta preta e efeito sobre o crescimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) por medicamentos homeopáticos. Marechal Cândido Rondon, 2009. 95p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Oeste do Paraná.
- XIAO, G. et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, EUA, v.2, p.483- 493, 2012.