

**MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL E ECOTOXICOLÓGICO DE BIOPESTICIDAS**

VERA LÚCIA S. S. DE CASTRO \*

DEISE MARIA FONTANA CAPALBO \*\*

ALDEMIR CHAIM \*\*\*

ALBERTO JORGE LARANJEIRO \*\*\*

CARLA MAZON SOARES \*\*\*\*

Pretendeu-se verificar se a metodologia proposta pelos protocolos internacionais para análise toxicopatológica dos biopesticidas é adequada ao estudo de seu risco de aplicação por pulverização em florestas no Brasil. Foram realizados testes toxicopatológicos em ratos, para verificação da persistência do microrganismo no animal e a possível ocorrência de danos provocados pela exposição ao *Bacillus thuringiensis*. A fim de analisar a toxicidade/patogenicidade dos biopesticidas testou-se em animais, a administração do produto pelas vias respiratória e oral, e realizou-se sua quantificação em órgãos e fezes, além da verificação de lesões na necropsia. Em relação a avaliação de sua persistência e disseminação no ambiente, availhou-se a presença do microrganismo em amostras de folhas verdes e em detritos no solo, em uma área de reflorestamento de eucaliptos, tratada por aplicação aérea e terrestre. Concluiu-se que a dose proposta nos protocolos internacionais de avaliação de risco do uso de biopesticidas está muito acima da dose encontrada em campo, entretanto sugere-se que sejam incluídos testes de exposição prolongada a diferentes doses.

## 1 INTRODUÇÃO

A análise ecotoxicológica vem sendo utilizada na avaliação da possibilidade de danos dos pesticidas químicos, quando de sua proposta

- \* Ph. D., Patologia & Toxicologia, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP  
(casiro@cnpma.embrapa.br).
- \*\* Eng<sup>a</sup> de Alimentos, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP
- \*\*\* Eng<sup>a</sup> Agr<sup>b</sup>, M.Sc., Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna - SP. (e-mail: aldemir@cnpma.embrapa.br).
- \*\*\*\* Eng<sup>a</sup> Florestal, M.Sc., Equilíbrio Proteção Florestal S/C Ltda, Piracicaba - SP.  
Biol<sup>a</sup>ga, Laboratório de Ecologia de Solos, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna - SP.

para uso em campo. Entretanto, estes testes não se aplicam na sua totalidade aos pesticidas microbiológicos. Fatores como a possibilidade de proliferação do microrganismo no organismo-teste e a ação patogênica do biopesticida exigem estudos aprofundados das interações entre o agente microbiano e o organismo-alvo, bem como o estabelecimento de novas metodologias padronizadas de análise.

Atualmente, os impactos ambientais causados por biopesticidas são estimados mediante testes que utilizam uma dose desafio do biopesticida, considerada de máximo risco (100 a 1000 vezes a dose utilizada em campo) (1). Estes testes, conduzidos em condições padronizadas de laboratório sobre organismos não-alvo como indicadores dos diversos compartimentos ambientais, não avaliam os danos provocados pela persistência do microrganismo no ambiente, nem tampouco se a dose desafio é adequada ou se os resultados obtidos refletem diretamente o risco apresentado.

Com o intuito de verificar se a análise toxicológica, baseada na dose desafio (1), é adequada ao estudo de risco de biopesticidas nas condições brasileiras foram eleitos o produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), o sistema florestal e as pulverizações aérea e costal como sistema de estudo. Para tanto, testou-se em animais de laboratório a administração do produto pelas vias respiratória e oral e no ambiente, bem como avaliou-se a presença ou ausência do microrganismo em amostras de folhas e solo da área aplicada. Além disso, foi avaliada a sensibilidade do método de recuperação do microrganismo a partir de amostras biológicas como base para análise de risco comparativo.

Cabe ressaltar que Btk é uma bactéria mesófila e aeróbica que produz esporos e um cristal protéico que constituem complexo tóxico a certos lepidópteros e está sendo utilizada no Brasil por diferentes métodos de aplicação, incluindo a aérea, em áreas de reflorestamento com eucaliptos. As análises e procedimentos aqui estudados, bem como possíveis extrapolações de comportamento aplicam-se a este tipo de entomopatógeno nessas características de atuação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 BIOPESTICIDA

Foi utilizada formulação comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) com potência 32.000 IU/mg. A quantificação dos esporos em termos de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), segundo metodologia descrita no item "análise microbiológica", foi realizada nos Laboratórios da Embrapa Meio Ambiente, indicando a presença de  $6,00 \times 10^8$  UFC/g do produto comercial.

## 2.2 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

### 2.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, de aproximadamente 250 g, mantidos em condições padronizadas de luz (círculo claroescuro 12h) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C).

Todos os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno. Tanto a comida quanto a água foram fornecidas a vontade com exceção dos casos devidamente indicados.

Para cada tratamento estudado foram utilizados 10 ratos machos e 10 fêmeas nas condições indicadas.

### 2.3 DOSES E TRATAMENTOS

A dose desafio foi de  $1 \times 10^8$  UFC por dose e por animal teste, a fim de determinar a toxicidade/patogenicidade do biopesticida. Os volumes administrados por animal teste não foram superiores a 0,3 mL/100 g peso para a via respiratória e 1,0 mL/100 g peso para a via oral.

Foram utilizados dois tratamentos para cada experimento, ou seja, (i) produto comercial convenientemente diluído, contendo o microrganismo ativo (AT) e (ii) controle (CT), constituído pelo veículo de administração ou suspensão do tratamento AT, isento do microrganismo (autoclavagem a 121 °C/20 min). Igual número de machos e fêmeas receberam os dois tratamentos.

### 2.4 VIAS DE EXPOSIÇÃO

#### 2.4.1 *Via oral*

As suspensões AT e CT foram administradas por via oral, usando-se cânula metálica adequada. A água e a ração foram retiradas 24h antes da administração por via oral da suspensão teste. Foi efetuada a análise microbiológica diária das fezes para verificar a presença de Btk neste material.

#### 2.4.2 *Via respiratória*

As suspensões utilizadas AT e CT foram administradas por via intratraqueal, com auxílio de laringoscópio introduzido na traquéia do animal, após anestesia superficial com éter.

## 2.5 OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS

### 2.5.1 Sinais e sintomas

Foram observados, diariamente, após exposição oral ou respiratória os seguintes itens: pele e pelo; olhos e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistema nervoso periférico e central (tremor, diarréias, convulsão, letargia e salivação); padrão comportamental e tempo de morte.

### 2.5.2 Patologias e presença do microrganismo

Todos os animais foram sacrificados ao final dos testes em cuba de vidro com algodão embebido em éter etílico e submetidos à necropsia com observação macroscópica dos órgãos. Os animais foram sacrificados no dia da administração (dia 0) após 1 hora desta, e no 1°, 3°, 7° e 14° dias após a exposição. A necropsia foi realizada dentro de câmara de fluxo laminar, sendo retirados então os órgãos para o estudo da persistência e da infectividade do biopesticida. Cada órgão foi pesado e homogeneizado com solução salina. A cada nova amostra, a haste do homogeneizador de tecidos e o material cirúrgico utilizados foram limpos com solução salina, seguida de solução de hipoclorito a 2% e solução salina, esterilizada, em frascos distintos.

Cada homogenizado foi diluído, plaqueado em meio adequado e em duplícata, segundo metodologia descrita para análise microbiológica. Recolheram-se 10 g de bolo fecal nos dias de sacrifício dos animais testados por via oral. O bolo fecal recolhido do intestino reto foi macerado e agitado em água esterilizada. Foram então realizadas as diluições e plaqueamento segundo método descrito para análise microbiológica para quantificação do microrganismo.

## 3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O material sob análise, devidamente homogeneizado, foi submetido a diluições seriadas em solução salina esterilizada para permitir a contagem de esporos bacterianos. As diluições adequadas foram submetidas a choque térmico (80 °C/10 min) e então plaqueadas em duplícata pelo método "pour-plate" em nutriente ágar segundo THOMPSON & STEVENSON (2).

As amostras plaqueadas foram incubadas a 30 °C por 24h. O número de colônias obtidas por placa (entre 25 e 250) foi anotado e o resultado expresso como média das repetições, transformado segundo cálculos de diluições, pesos e volumes e apresentado como UFC/g do material biológico analisado.

## 4 QUANTIFICAÇÃO AMBIENTAL DE Btk

### 4.1 EXPOSIÇÃO

A deposição do biopesticida foi avaliada após cada um dos três métodos de aplicação utilizados: pulverização eletrostática com carga (PEC), sem carga (PES), e pulverização aérea (PA). Para a pulverização eletrostática foi utilizado canhão Berthoud, modelo AF super 600, modificado pela disposição de conjunto de 8 bicos eletrostáticos (3), calibrados para aplicar volume total de 7 L/ha. A pulverização sem carga eletrostática foi realizada com o mesmo equipamento, desligando-se somente o sistema de indução eletrostática. Para a pulverização aérea utilizou-se avião Ipanema Embraer 202, equipado com 6 bicos Micronair AU 5000, calibrado para aplicar o total de 20 L/ha.

Foram realizadas aplicações em áreas com plantio de diferentes idades: uma em plantio de 2 anos, com árvores de aproximadamente 13 metros de altura e outra com 2,7 anos de idade e árvores de aproximadamente 20 metros de altura. Cada parcela envolveu área com 50 metros de comprimento por 40 metros de largura, sendo as amostragens realizadas nas três linhas mais próximas do pulverizador (no caso da pulverização eletrostática) ou nas três linhas centrais do tratamento usando avião. As pulverizações foram realizadas com calda contendo  $2,6 \times 10^8$  UFC/L do produto comercial. A deposição foi quantificada em amostras de folhas verdes, das copas das árvores, e do resíduo de folhas e outros materiais que cobriam o solo, sendo cada tipo de amostra coletado menos de três horas após a aplicação.

### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO

Para a quantificação da deposição de Btk em folhas verdes foram coletadas cerca de 10 folhas por planta, mantidas em sacos plásticos e acondicionadas em gelo ou em geladeira até o momento da análise. Apenas cinco destas folhas verdes foram utilizadas para análise. Sua área foliar foi determinada em aparelho LI-COR, modelo LI 3100. Para a quantificação de esporos do Btk, as folhas foram picadas manualmente e agitadas em 100 mL de solução de NaCl 0,85% e gotas de Tween 80. Depois de diluições convenientemente foram submetidas a contagem de esporos segundo metodologia de análise microbiológica já descrita.

A amostragem sob as árvores foi realizada retirando-se cerca de 10 gramas deste material, a 5 cm de profundidade, nas entrelinhas dos eucaliptos. Colocou-se o material coletado em sacos plásticos, devidamente identificados, que foram mantidos em gelo ou geladeira até o momento da análise. Cada amostra foi colocada em frasco Erlenmeyer, contendo 100 mL de solução de NaCl 0,85%, esterilizado, tendo então tratamento igual ao descrito para as folhas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBSERVAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Os animais não apresentaram alterações clínicas durante os experimentos, nem a necropsia detectou alterações quando da administração por quaisquer das vias utilizadas.

### 5.2 QUANTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os resultados obtidos para a quantificação do microrganismo nas fezes estão apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1 - PORCENTAGEM DE ANIMAIS QUE APRESENTARAM ESPOROS DE Btk NAS FEZES APÓS EXPOSIÇÃO ORAL**

Grupos de animais	Dias de observação						
	1	2	3	4	5	6	7
Experimental (%)	100	100	100	100	83,33	33,33	0
Controle (%)	0	0	0	0	0	0	0

Foi possível detectar a presença do Btk nas fezes dos animais até

seis dias após a exposição por via oral (Tabela 1). Neste dia, foram encontrados  $5,4 \times 10^6$  e  $4,3 \times 10^4$  UFC/10 g de fezes, nos grupos "macho" e

"fêmea", respectivamente. Após o sétimo dia, nenhum esporo de Btk foi recuperado. Este resultado indica a possibilidade de dispersão do agente microbiiano no ambiente. Também justifica futuros testes que simulem as condições de exposição natural, nos quais deverá ser verificada a viabilidade do microrganismo, sob a forma de esporos, durante grande período no campo. Neste sentido, SUNDARAM et al. (4) ao estudarem a persistência e o depósito de formulação comercial de Btk por aplicação aérea, usando larvas de *Choristoneura fumiferana* como espécie indicadora, mostraram que a ação tóxica mensurável do Btk persiste por até 18 dias após aplicação na dose de 30 BIU em 1,5 L/ha.

A quantificação nos órgãos avaliados após exposição por via intratraqueal encontra-se na Tabela 2.

**TABELA 2 - AVALIAÇÃO DOS ÓRGÃOS QUANTO A PRESENÇA DE ESPOROS DE Btk APÓS 1 HORA DE SUA ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRATRAQUEAL (DIA 0)**

Tecido (1)	Grupo Controle		Grupo Experimental	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Cérebro	nd	$2,6 \times 10^3$	$<1,6 \times 10^2$	nd
Coração	nd	nd	nd	nd
Pulmão	nd	$<1,4 \times 10^3$	nd	nd
Baço	nd	$<1,8 \times 10^2$	$<5,1 \times 10^2$	nd
Sangue (2)	nd	$<2,0 \times 10^2$	nd	$<1,0 \times 10^2$

nd = Btk não detectado.

(1) = UFC/g de tecido.

(2) = UFC/mL.

Nos outros dias de teste não se constatou a presença de esporos de Btk, exceto no pulmão que apresentou  $<3,0 \times 10^2$  no 7º dia após a exposição.

O método utilizado mostrou-se adequado para análise da infectividade e persistência do microrganismo nas várias amostras coletadas do organismo animal, uma vez que os resultados estão de acordo com os trabalhos realizados por McCLEINTOCK (5) e condizem com a ausência de sintomas e de danos nos órgãos estudados. O limite de detecção do método mostrou-se também adequado, visto que foi possível realizar contagem da ordem de 100 esporos/g do órgão mais diretamente exposto ao tratamento, após terem sido administrados cerca de  $10^6$  esporos por animal.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE Btk EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de deposição de Btk em plantas de eucaliptos. A pulverização aérea proporcionou a maior deposição de esporos na superfície das folhas, nos dois estádios de desenvolvimento. Tal resultado condiz com os de SUNDARAM et al. (6), que verificaram que a deposição na região mediana das plantas decresceu na seguinte ordem de equipamento: avião, pulverizador tratorizado e bico hidráulico/avião.

A pulverização PEC promoveu maior deposição nas plantas de menor porte e a PES nas plantas de maior porte. Esta diferença observada para a pulverização eletrostática está relacionada à altura com que o jato

de gotas foi direcionado durante a pulverização em cada caso. O equipamento eletrostático foi calibrado para aplicar faixas de 40 metros de largura, e o ângulo do canhão foi direcionado para que, no centro da faixa, a altura do jato de gotas atingisse em torno de 15 metros. Assim, no caso das plantas mais altas, a nuvem principal de gotas provavelmente não atingiu a folhagem do eucalipto. O maior efeito de deposição da aeronave pode ser creditado ao fato da faixa de aplicação aérea restringir-se a apenas 18 metros de largura.

**TABELA 3 - DEPOSIÇÃO DE BTK EM FOLHAS DE EUCA利PTOS, EXPRESSA EM UFC/cm<sup>2</sup> DE FOLHA**

Porte da cultura	PES <sup>1</sup>	PEC <sup>2</sup>	PA <sup>3</sup>	TEST <sup>4</sup>
13 m	$5,7 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$
20 m	$1, \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	$2,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$

<sup>1</sup> Pulverização eletrostática sem carga (tralonizada).

<sup>2</sup> Pulverização eletrostática com carga (tralonizada).

<sup>3</sup> Pulverização aérea.

<sup>4</sup> Testemunha (sem aplicação).

As perdas de produtos para o solo foram analisadas como deposição no material orgânico na superfície abaixo das plantas (Tabela 4).

**TABELA 4 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PERDA DE PRODUTO PARA O SOLO, EXPRESSA EM PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA**

Concentração qualitativa <sup>1</sup>	PES <sup>2</sup>	PEC <sup>3</sup>	PA <sup>4</sup>
+++	50	10	40
++	27	33	57
+	23	57	3

<sup>1</sup> (+) contagens <30 UFC/g; (++) contagens entre 30 e 50 UFC/g; (+++) contagens >50 UFC/g.

<sup>2</sup> Pulverização eletrostática sem carga.

<sup>3</sup> Pulverização eletrostática com carga.

<sup>4</sup> Pulverização aérea.

Nestes experimentos a manutenção da amostra após a coleta foi dificultada, pois o material colhido em campo continha folhas recém caídas

das árvores, gravetos, folhas secas, insetos, material em decomposição, além de algum material úmido (sub-superfície desta camada de componentes). Esta multiplicidade de componentes, aliada a presença de muita umidade não permitiu sua conservação por longo período, pois algumas amostras entraram em decomposição. Ao chegar ao laboratório para análise, este material, que não era homogêneo em sua composição original, apresentava muita matéria aderida às paredes do saco de acondicionamento e ao mesmo tempo algum material de maior tamanho ainda seco (como insetos e gravetos). Tal fato dificultou a determinação de sub-amostra homogênea, pois não foi possível realizar secagem sem perdas significativas, e tampouco conheceu-se a massa para poder homogeneizar todo o conteúdo da amostra original. Frente a esta dificuldade de quantificação realizou-se a determinação microbiológica de forma semi-quantitativa, homogeneizando-se o conteúdo total das amostras (peso da amostra determinado após sua adição aos frascos de diluição) em solução descrita na metodologia. Feitas as diluições sequenciais e realizada a contagem de esporos, conforme indicado na metodologia, considerou-se três grupos de resultados: (+) contagens <30 UFC/g; (++) contagens entre 30 e 50 UFC/g; (+++) contagens >50 UFC/g. O percentual de amostras contendo as contagens assim determinadas foi calculado para cada tipo de aplicação – PES, PEC, PA.

Pode ser observado que a pulverização PEC resulta em menor desperdício de produto do que a PES e a pulverização aérea. Isto confirma as informações apresentadas por HISLOP (7) de que a pulverização eletrostática pode reduzir em 20 vezes a contaminação do solo quando comparada à pulverização convencional. Também, SUNDARAM et al. (6) compararam a deposição entre a pulverização aérea empregando Micronair e bicos hidráulicos D8-46 e equipamento tracionado. Os resultados do estudo indicam que a deposição média de gotas nas diferentes regiões das plantas de nogueira variaram de acordo com a posição de amostragem e o volume de aplicação, e que a meia vida da toxina proteica do produto é afetada pelo grau de deposição. Percebe-se assim a necessidade de mais estudos para verificar a influência do grau de deposição nas plantas, proporcionado pela pulverização, na persistência do Btk na área aplicada.

Devido às dificuldades encontradas na determinação quantitativa de deposição nas amostras de material de cobertura do solo não foi possível comparar as Tabelas 3 e 4. Entretanto pode-se afirmar que a dose verificada em campo ( $10^3$ /cm<sup>2</sup>), conforme Tabela 3, foi inferior àquela administrada aos animais (dose desafio equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC por animal teste) de acordo com os protocolos internacionais (1).

Poucos são os estudos sobre a eficiência de aplicação de Btk em florestas com diferentes tipos de pulverizadores, sendo que os principais resultados disponíveis na literatura foram observados em florestas de pinheiros ou nogueiras, em países de clima temperado (4, 6). Apesar de tais estudos levarem em consideração aspectos técnicos do método, como

tamanho da gota e tempo de aplicação (8, 9) ou ainda utilizarem simuladores gráficos (10), há alguns pontos relativos à aplicação de biopesticidas que permanecem a espera de melhores soluções. Assim, a determinação da eficiência residual de Btk, o desenvolvimento de apoio público a sua aplicação em florestas, e o estabelecimento de zonas apropriadas e de critérios de aplicação para evitar problemas ambientais são ainda pontos a serem considerados (11). Percebe-se assim a necessidade de mais estudos visando verificação da influência do grau de deposição nas plantas, proporcionado pela pulverização na persistência do Btk na área aplicada.

Os resultados apresentados para as amostras biológicas e amostras ambientais, juntamente com o fato das doses utilizadas neste estudo serem superiores às doses encontradas em campo, indicam que o risco de intoxicação aguda de mamíferos (função de exposição e de dano) é praticamente inexistente. Entretanto, se a ação tóxica mensurável do Btk, em condições similares às deste estudo, puder persistir por até 18 dias em campo, conforme observado por SUNDARAM et al. (12), os microrganismos presentes no biopesticida poderiam constituir risco pois a probabilidade de exposição seria prolongada.

## 6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a dose proposta nos protocolos internacionais de avaliação de risco do uso de biopesticidas está muito acima da dose detectada em campo.

Sugere-se a inclusão nos protocolos de estudo brasileiros, de testes de exposição prolongada de mamíferos a diferentes doses. Tais testes necessitam, entretanto, ser otimizados para que possam refletir com precisão a segurança no uso dos biopesticidas em relação a animais como pequenos roedores presentes no local. Estes ao se alimentarem poderiam ingerir esporos que permaneceriam no organismo por tempo não estabelecido, fato este ainda não determinado como totalmente isento de perigo, principalmente se houver situação de estresse ambiental.

## Abstract

This study was developed in order to verify if the toxic pathological methodology proposed by international protocols is adequate to detect the risk posed by biological control agents applied in forests in Brazil. Toxicopathological tests were realized in rats to verify the persistence of the microorganism into the animal and the occurrence of any damage provoked by the exposition to *Bacillus thuringiensis* (Btk). In order to analyze the toxicity/pathogenicity of the biopesticides, it was tested in animals by oral and respiratory administration and the presence of Btk was measured in biological tissues and in feces, besides the clinical observations before and after necropsy. For environmental analysis, green leaves and litter were sampled in the application area after the tratorized or aerial

spraying. It was concluded that the challenge dose proposed by protocols are higher than the observed dosages found in the field, however it is suggested that tests oflingeing exposition are included to different doses.

## REFERÊNCIAS

- 1 EPA. **Pesticide assessment guidelines.** Subdivision M: Microbial pest control agents and biochemical pest control agents. Washington, 1989. 192 p.
- 2 THOMPSON, P. J.; STEVENSON, K. E. Mesophilic sporeforming aerobes. In: SPECK, M. (Ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 2<sup>nd</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 1984. Cap. 19, p. 211-220.
- 3 CHAIM, Aldemir; LARANJEIRO, Alberto Jorge; CAPALBO, Deise Maria Fontana. **Bico pneumático eletrostático para aplicação de inseticidas biológicos em floresta de eucalipto.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33 p. (Embrapa Meio Ambiente, Boletim de Pesquisa, 3).
- 4 SUNDARAM, A.; SUNDARAM, K.M.; HUDDLESTON, E.; NOTT, R.; SLOANE, L.; ROSS, J.; LEDOSON, M. Deposition, distribution, persistence and fate of *Bacillus thuringiensis* variety *Kurstaki* (Btk) in pecan orchards following aerial and ground applications to control pecan nut casebearer larvae. **Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. B32, n. 5, p. 741-788, 1997.
- 5 McCLINTOCK, J.; SCHAFFER, C.; SJOBBLAD, R. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*: based pesticides. **Pesticide Science**, v. 45, p. 95-105, 1995.
- 6 SUNDARAM, A.; SUNDARAM, K.M.S.; NOTT, R.; CURRY, J.; SLOANE, L. Persistence of *Bacillus thuringiensis* deposits in oak foliage, after aerial application of Forev® 48B using rotary and pressure atomisers. **Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. B32, n. 1, p. 71-105, 1997.
- 7 HISLOP, F.C. **Electrostatic ground-ring spraying: an overview.** **Weed Technology**, North Dakota, v. 2, p. 94-104, 1988.

- 8 DUBOIS, N.; MERZEJEWSKI, K.; REARDON, R.; McLANE, W.; WITCOSKY, J. *Bacillus thuringiensis* field applications: effect of nozzle type, drop size, and application timing on efficacy against gypsy moth. *Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. B29, n. 4, p. 679-696, 1994.
- 9 SUNDARAM, A.; SUNDARAM, K.M.; LEUNG, J.; SLOANE, L. Droplet size spectra and deposits of two aerially sprayed *Bacillus thuringiensis* formulations on artificial samplers and live foliage. *Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. B29, n. 4, p. 697-738, 1994.
- 10 HALL, F.; CHAPPLE, A.; TAYLOR, R.; DOWER, R. Dose transfer of *Bacillus thuringiensis* from cabbage to the diamondback moth: a graphical simulator. *Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. B29, n. 4, p. 661-678, 1994.
- 11 CAMPBELL, R.; HOWARD, C. Priorities for forestry insecticide application technology research. *Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. B29, n. 4, p. 591-620, 1994.
- 12 SUNDARAM, A.; SUNDARAM, K.M.S.; SLOANE, L. Spray deposition and persistence of a *Bacillus thuringiensis* formulation (Forey® 76B), on spruce foliage, following aerial application over a northern Ontario forest. *Journal of Environmental Science and Health. Part B - Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. B31, n. 4, p. 763-813, 1996.