

**Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas
Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica**

Wesley Botelho Sousa

**CARACTERIZAÇÃO DO *Baculovirus spodoptera* QUANTO AS VARIAÇÕES DE pH
E TEMPERATURA**

Uberaba

2015

Wesley Botelho de Sousa

**CARACTERIZAÇÃO DO *Baculovirus spodoptera* QUANTO AS VARIAÇÕES DE pH
E TEMPERATURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Tecnológica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Hitomi Okura
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente

Uberaba

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S698c Sousa, Wesley Botelho
Caracterização do *baculovirus spodoptera* quanto às variações de pH e
temperatura / Wesley Botelho Sousa. -- 2015.
70 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) -- Uni-
versidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015

Orientadora: Prof. Dr. Mônica Hitomi Okura
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente

I. Inseticidas virais. 2. Baculoviridae. 3. Milho • Doenças e pragas.
I. Okura, Mônica Hitomi. II. Valicente, Fernando Hercos. III. Universidade
Federal do Triângulo Mineiro. IV. Título.

CDU 632.951

WESLEY BOTELHO SOUSA

CARACTERIZAÇÃO DO BACULOVIRUS SPODOPTERA QUANTO AS
VARIAÇÕES DE PH E TEMPERATURA

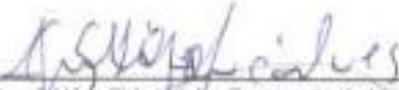
Trabalho de conclusão apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Inovação Tecnológica da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como requisito
para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 01 de julho de 2015

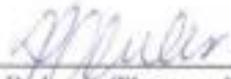
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Mônica Hitomi Okura
Orientadora – PMPIT - UFTM



Prof. Dr. Júlio César de Souza Inácio Gonçalves
Membro Titular – UFTM



Prof. Dr. Robson Thomaz Thuler
Membro titular – IFTM

Dedico esta dissertação aos meus pais, meus amigos e minha namorada pelo apoio e sustentação durante todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Dr^a Mônica Hitomi Okura e Dr. Fernando Hercos Valicente pela paciência, compreensão empregada em me atender nos momentos mais importantes e pela confiança depositada no meu trabalho.

A professora Lúcia Scatena pela ajuda na análise estatística dos dados que foi de significativa importância na qualidade desse trabalho.

Ao Matheus (técnico do laboratório) e a Karen (aluna iniciação científica) pela ajuda prática durante os testes mesmo nos horários impróprios.

Ao Ênio pela atenção, competência e confiança, sempre disposto a ajudar no que for possível para que o trabalho seja desenvolvido com sucesso.

Ao Paulo Bittar (diretor da empresa Vitae Rural Biotecnologia) e todos os colaboradores pela transparência e confiança em mim imposta durante estes anos de projeto.

Aos meus pais Ronildo e Maria Aparecida pelos ensinamentos que me deram suporte para alcançar meus objetivos e forma vitoriosa.

A minha namorada Luana pela paciência, ajuda e apoio principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo Tharsus pela parceria do conhecimento de forma fiel e honesta, sempre disposto a ajudar da melhor maneira possível.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	13
Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a DL50.....	22
CAPÍTULO 2	30
Tabela 2. Análise de variância para o efeito da solução de Ácido Ascórbico 0,0125% g/v na exposição ao <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV).....	45
CAPÍTULO 3	52
Tabela 3. Análise de variância para o efeito da temperatura na exposição ao <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV).	64
Tabela 4. Mortalidade média e EPM de <i>S. frugiperda</i> (infectadas e contaminadas) após exposição do inóculo de <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV), a diferentes níveis de temperatura.	66

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	13
Figura 1. Micrografia eletrônica de tecido de lagartas do cartucho infectadas, <i>S. frugiperda</i> experimentalmente. (A) e (B): infecção por um isolado de nucleopoliedrovírus (MVPN), podendo-se observar os poliedros, os vírions e a matriz protéica de poliedrina. Notar que vários nucleocapsídeos estão envoltos por uma membrana comum; (C): granulovírus (VG), onde se é observado apenas um capsídeo por envelope protéico; (D) e (E): tecidos infectados por nucleopoliedrovírus, podendo-se observar células contendo em seus núcleos vírions e poliedros	24
Figura 2. Lagarta infectada pelo baculovirus	26
CAPÍTULO 2.....	30
Figura 3. Gaiola em PVC das mariposas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	38
Figura 4. Lagarta individualizada após ingestão do baculovírus e lagartas mortas infectadas.....	39
Figura 5. Número de poliedros de SfMNPV após tratamento com as soluções de pH.....	44
Figura 6. Mortalidade de <i>S. frugiperda</i> , após inoculação de SfMNPV tratados com soluções de diferentes pH.....	46
Figura 7. Eficiência bacteriana no inóculo de SfMNPV após tratamento com diferentes soluções de pH.....	47
Figura 8A. Aglomerados de baculovírus (B) após tratamento com solução de ácido acético 0,1%	48
Figura 8B. Aglomerados de baculovírus após tratamento com solução de ácido ascórbico 0,5%	48
Figura 8C. Aglomerados de baculovírus (B) após tratamento com solução de ácido clorídrico 0,01%	48
Figura 8D. Poliedros (A) representados na amostra controle (inóculo + água)	48
Figura 8E: Poliedros (A) e aglomerados de baculovírus (B) após tratamento com solução de ácido ascórbico 0,0125%.....	49
CAPÍTULO 3	52

Figura 9. Contagem de Poliedros do inóculo a partir da exposição de diferentes temperaturas.....	65
Figura 10. Aglomerações de poliedros quando submetidos a temperatura de 10°C por 30 minutos.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<i>B. spodoptera</i>	<i>Baculovirus spodoptera</i>
BVs	Budded virions
ICTE	Instituto de Ciência e Tecnologia Exata
ClO ⁻	Hipoclorito
cm	Centímetros
CNPMS	Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPM	Erro Padrão Médio
g	Gramas
g/v	Gramas por volume
h	Horas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MNPV	Vírus de múltiplos nucleocapsídeos
pH	Potencial hidrogeniônico
pol/mL	Poliedros por mililitros
PVC	Policloreto de polivinila
rpm	Rotações por minuto
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SNPV	Vírus de simples nucleocapsídeos
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro

USDA	United States Department of Agriculture
v/v	Volume por volume
VG	Granulovirus
VPN	Nucleopoliedrovirus

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 CULTURA DO MILHO	18
2.2 AGROTÓXICOS	19
2.3 LAGARTA <i>Spodoptera frugiperda</i>	21
2.4 BACULOVIRUS.....	22
3 OBJETIVO GERAL	26
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
1 INTRODUÇÃO	32
2 OBJETIVO GERAL	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 CRIAÇÃO DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	35
3.2 MULTIPLICAÇÃO DE <i>Baculovirus spodoptera</i>	36
3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	37
3.4 CONTAGEM DE POLIEDROS	37
3.5 TESTE DE pH COM <i>Baculovirus spodoptera</i>	37
3.5.1 Teste com diferentes pHs	37
3.5.2 Análise Bacteriana.....	38
3.5.3 Análise da viabilidade do <i>Baculovirus spodoptera</i> após tratamento com diferentes pHs	38
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 3	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 OBJETIVO GERAL	53
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 CRIAÇÃO DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	54
3.2 MULTIPLICAÇÃO DE <i>Baculovirus spodoptera</i>	54
3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
3.4 CONTAGEM DE POLIEDROS	55
3.5 TESTE DE TEMPERATURA COM <i>Baculovirus spodoptera</i>	55
3.5.1 Teste com diferentes temperaturas	56
3.5.2 Análise da viabilidade do <i>Baculovirus spodoptera</i> após tratamento com diferentes temperaturas	56
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 4	64

CAPÍTULO 1

IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DO *Spodoptera frugiperda* *multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) COMO CONTROLE BIOLÓGICO

RESUMO

A redução da produção de milho pode chegar a 73% em condições de ataque elevado de *Spodoptera frugiperda*, sua principal praga. Para o combate à lagarta do cartucho, foi desenvolvido um biopesticida em pó passível de produção em escala industrial para ser utilizado pelo agricultor sendo esse produto a base de cepas de *Baculovirus spodoptera*. Em 2006, pesquisadores da EMBRAPA Milho e Sorgo isolaram uma cepa de *Baculovirus spodoptera* que não rompe os tecidos da lagarta após sua morte (isolado 6 NR). Os ensaios realizados com este novo isolado demonstraram resultados positivos que alcançaram mais de 90% de mortalidade de lagartas. Todos os baculovírus têm uma mesma estrutura básica, um capsídeo coberto de forma arredondada. O nucleocapsídeo é uma estrutura cilíndrica de DNA e proteína. Dentro dele, a fita dupla de DNA associa-se heterogeneamente com uma proteína básica e forma um “core” cilíndrico. O gênero VPV é caracterizado por possuir dois subgêneros: “Vírus de Simples Nucleocapsídeo” - SNPV, onde apenas um capsídeo é encontrado por envelope e aqueles chamados de “Vírus de Múltiplos Nucleocapsídeos” - MNPV, no qual vários nucleocapsídeos são encontrados em um envelope comum. Os VGs tem apenas um capsídeo por envelope, possuem as oclusões virais na forma de grânulo, contendo um e raramente dois ou mais vírions por grânulo. A oclusão das partículas virais em matriz proteica é uma característica extremamente importante. É o que garante proteção e possibilita a transmissão horizontal do vírus, ou seja, de um inseto para outro. A lagarta do cartucho ao se alimentar da folha do milho contendo as partículas de baculovírus, infecta-se através da penetração dos corpos virais no sistema digestivo. O pH alcalino presente no intestino médio da lagarta quebra a matriz proteica de proteção do vírus, liberando os vírions, onde suas proteínas se ligam às proteínas presentes nas membranas das células epiteliais do intestino. No processo de infecção, o inseto é debilitado, perdendo capacidade motora e de alimentação, se deslocando para as partes superiores da planta hospedeira, onde morre em 5 a 8 dias, apresentando o corpo descolorido (rosa-esbranquiçado) em relação à lagarta sadia. Dois dias após a morte da lagarta, o corpo do inseto se rompe, liberando grande quantidade de vírus sobre partes da planta. Dessa forma, lagartas infectadas ou mortas servem de inóculo para a transmissão horizontal do vírus.

Palavras chave: Lagarta do cartucho, VPV, Milho.

ABSTRACT

The reduction in maize production could reach 73% in high attack conditions *Spodoptera frugiperda*, a major pest. To combat armyworm, it was developed a biopesticide in powder capable of producing on an industrial scale to be used by the farmer and this product based on baculoviruses *Spodoptera* strains. In 2006, Embrapa Maize and Sorghum researchers isolated a baculovirus *Spodoptera* strain that does not break the caterpillar tissues after his death (isolated 6 NR). Tests carried out with this new isolated showed positive results achieved over 90% mortality of larvae. All baculovirus have the same basic structure, a covered capsid rounded. The nucleocapsid is a cylindrical structure of DNA and protein. Inside, the double-stranded DNA is associated with heterogeneously with a basic protein and form a "core" cylindrical. The VPN genus is characterized by having two subgenres: "Simple virus nucleocapsid" - SNPV where only one capsid is found by envelope and those called "Multi-nucleocapsid Virus" - MNPV, where multiple nucleocapsids are found in a common envelope. The VGs has only one capsid per envelope, the viral occlusions have the form of granule, and rarely containing two or more virions per bead. Occlusion of viral particles in protein matrix is an extremely important feature. This is what ensures protection and enables the horizontal transmission of the virus, or an insect to another. The caterpillar cartridge by feeding the corn leaf containing the baculovirus particles, it infects by viral penetration bodies in the digestive system. The pH of alkali present in the midgut of the caterpillar breaks the protein matrix of virus protection, releasing virions where their proteins bind to proteins present in the membranes of intestinal epithelial cells. In the process of infection, the insect is debilitated, losing motor and power capacity, moving to the upper parts of the host plant, where he died in 5-8 days, showing the body discolored (pink-white) compared to a healthy caterpillar. Two days after the death of the caterpillar, insect body breaks down, releasing large amounts of virus on plant parts. Thus, infected or dead caterpillars serve as inoculum for horizontal transmission of the virus.

Keywords: cartridge Caterpillar, VPN, corn.

1 INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), é a principal praga do milho no Brasil, podendo reduzir a produção de grãos em até 73%. Até 2007 o método de controle desta praga foi feito, essencialmente, com a aplicação de inseticidas químicos, sendo que, em algumas regiões, o número de aplicações chegava a 15 durante o ciclo da cultura. Em 2008, foram introduzidas no mercado nacional as plantas transgênicas (RUBIN, 2009). A tecnologia foi amplamente aceita chegando em 2012, nas principais regiões produtoras do país, a mais de 90% de milho transgênico plantado. Uma comodidade para o produtor. Mas uma série de circunstâncias, tais como o clima tropical, a maciça produção durante todo o ano, sem vazios sanitários, característicos de inverno rigoroso, como ocorre em outros países, a não implantação de área de refúgio, entre outros, provocaram a infestação por lagartas, justamente nas plantas transgênicas (RUBIN, 2009). Os fatores acima mencionados e a exposição maciça da proteína transgênica podem ter acelerado a seleção natural de lagartas resistentes à essa tecnologia.

Em 2013 foi constatada a infestação por lagartas dos gêneros *Helicoverpa* e *Spodoptera* em pelo menos 11 estados brasileiros, inclusive em plantações que utilizavam a tecnologia dos transgênicos (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013). No oeste baiano, associações, sindicatos e figuras públicas de várias esferas se mobilizaram num movimento que culminou com a decretação pelo Ministério da Agricultura de Emergência Fitossanitária.

Para o combate à lagarta do cartucho, foi desenvolvido um biopesticida em pó para venda em escala comercial. Esse produto em destaque, foi formulado de *Baculovirus spodoptera*. No entanto, o isolado utilizado ocasionava a liquefação do tegumento da lagarta depois de morta era um grande problema que afetava a produção deste biopesticida em escala comercial, pois havia a necessidade de se congelar o inseto morto para a coleta do vírus, aumentando os custos de produção. Em 2006 foi encontrado pelos pesquisadores da EMBRAPA Milho e Sorgo um isolado de *Baculovirus spodoptera* que não rompe os tecidos da lagarta após sua morte (isolado 6 NR). Os ensaios realizados com este novo isolado, demonstraram resultados positivos, alcançando mais de 90% de mortalidade das lagartas (VALICENTE; TUELHER, 2009).

Torna-se importante salientar que a produção em escala industrial de *Baculovirus spodoptera* é inédita no Brasil e no mundo, constituindo-se assim como fator de inovação da presente pesquisa.

Existem alguns produtos para controle biológico da lagarta do cartucho, como por exemplo o *Bacillus thuringiensis* e o *Trichogramma*, e vários agrotóxicos.

O lançamento de uma formulação comercial do *B. spodoptera* é visto como muito importante por agricultores, empresas que comercializam produtos para controle biológico ou convencional e assessorias agrícolas. No entanto, para que se torne realidade algumas características do *Baculovirus spodoptera*, como, comportamento viral em diferentes níveis de pH e temperatura máxima suportada por ele sem danificá-lo, são essenciais para o desenvolvimento satisfatório em escala industrial, visando redução de custo e elevado nível de qualidade do produto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O principal objetivo da agricultura é garantir qualidade e quantidade na produção de alimentos. O crescimento demográfico observado nos últimos anos acarreta a queda da área total cultivada, o que obriga os produtores a aumentar a produção de alimentos em uma mesma área explorada. A ameaça das pragas agrícolas acarreta prejuízos que podem alcançar cerca de um terço da produção total de alimentos, com destaque para os insetos que são o maior grupo de animais existentes (SARMENTO *et al.*, 2012).

2.1 CULTURA DO MILHO

Cultivado mundialmente, o milho é utilizado como fonte principal na alimentação animal, sendo responsável por aproximadamente 70% do alimento de aves e suínos. O desenvolvimento da agricultura nos últimos anos fez com que a área de cultivo do milho elevasse de 127 milhões de hectares (1987/88) para 156,9 milhões em 2009/10. Os maiores produtores de milho do mundo são Estados Unidos da América, China, União Europeia e o Brasil que é o quarto com 6,45% da produção mundial de acordo com a USDA (FERREIRA FILHO *et al.*, 2010).

O aumento dos índices de produção do milho no mundo foi acompanhado também pelo crescimento no Brasil, onde na década de 1990 foram produzidos 30 milhões de toneladas, e cerca de 58,9 milhões em 2008. Segundo o USDA, o Brasil no ano de 2009 exportou 7,7 milhões de toneladas de milho, tendo um aumento em 2010 para 9,5 milhões. Com isso, o país se tornou o segundo maior exportador mundial de milho, destacando-se como um dos principais países referência do agronegócio mundial. Em todo o território brasileiro as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são as principais produtoras de milho, com destaque para a região Sul com mais de 40% da produção nacional (FARIAS, 2008; FERREIRA FILHO *et al.*, 2010).

A redução da produção de milho pode chegar a 73% em condições de ataque elevado da lagarta do cartucho. Os inseticidas químicos são comumente usados para diminuir riscos produtivos e conseqüentemente econômicos da lavoura, tendo seu custo calculado entre 500 e 600 milhões de dólares. No Brasil este controle tem sido realizado com 10 chegando a 14 aplicações de químicos na cultura de milho. Apesar do uso de produtos químicos ser satisfatório para o problema, a elevada toxicidade pode colocar em risco a saúde do homem e

causar prejuízos a natureza (MOSCARDI e SOUZA, 2002; VALICENTE *et al.*, 2008, VALICENTE e TUELHER, 2009).

Considerando todas as pragas que atacam a cultura do milho, a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*, necessita de elevado investimento para seu controle, devido a seu alto potencial de prejuízo, sendo a praga principal da cultura no Brasil. As lagartas mais jovens raspam um lado do tecido foliar, expondo do lado oposto a epiderme do tecido. No segundo e terceiro instares, as lagartas perfuram as folhas, atacando em seguida o cartucho da planta do milho (FIGUEIREDO; MARTINS-DIAS; CRUZ, 2006, VALICENTE e TUELHER, 2009, FERREIRA FILHO *et al.*, 2010, VALICENTE *et al.*, 2013).

De acordo com Ferreira Filho *et al.* (2010) os danos da *S. frugiperda* nas folhas de milho na fase de florescimento podem reduzir em até 20% a produção. Na lavoura do milho safrinha, as lagartas destroem principalmente as folhas centrais no início do ciclo de crescimento da planta e no final desta fase se alimentam da espiga. Ainda segundo Ferreira Filho *et al.* (2010), o aumento do acometimento da lagarta a partir do estágio de plântula (40 dias de germinação), causa prejuízo devido à redução no tamanho das plantas e espigas. Nos primeiros indícios de ataque das lagartas aos 34, 49, e 64 dias após o plantio, as taxas de redução de produtividade são de 15%, 29% e 34%, respectivamente.

2.2 AGROTÓXICOS

Na década de 1960, com a Revolução Verde, houve a expansão do uso de agrotóxicos. Essa revolução consistiu na utilização de técnicas agrícolas baseadas no uso de insumos químicos e instrumentos mecânicos pelos países menos desenvolvidos. Com isso, os produtores agrícolas aumentaram os recursos para a expansão de produção em uma mesma área plantada (FERREIRA, 2015).

O uso abusivo de agrotóxicos na produção de alimentos gerou agentes poluidores responsáveis por danificar ecossistemas contribuindo com a poluição ambiental. As práticas inadequadas de manejo a campo e o uso de substâncias químicas no controle de doenças e pragas agrícolas, podem causar danos irreversíveis à saúde humana ao ambiente (SILVA *et al.*, 2015). Pimentel, em 1991, apresentou estudo demonstrando que menos de 0,1% dos agrotóxicos aplicados nas culturas atingem as pragas-alvo, assim, uma elevada taxa desses produtos é perdida durante o processo de aplicação. Com isso o cenário atual já é bastante preocupante, do ponto de vista da saúde pública levando em conta que as expectativas são de agravamento dos problemas nos próximos anos (DOMINGUES *et al.*, 2004).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) demonstrou resultados que expõem os riscos da pulverização aérea. Rotineiramente, os equipamentos de pulverização, mesmo com calibração, temperatura e ventos ideais – aplicam 32% dos agrotóxicos pulverizados nas plantas, sendo o restante depositado no solo ou disperso no ar atingindo áreas próximas a aplicação (FERREIRA, 2015).

A manipulação incorreta dos insumos agrícolas é a principal causa de problemas de saúde no campo. Os trabalhadores rurais que pulverizam com agrotóxicos as lavouras, se expõem à alta toxicidade destes insumos, ignorando as boas práticas de uso de equipamentos de proteção tornando-se o principal alvo dos seus efeitos adversos. O uso de equipamentos de proteção é essencial, pois exerce um desempenho muito importante que ajuda a reduzir o impacto de produtos agroquímicos na saúde pública (DOMINGUES *et al.*, 2004; CASALI *et al.*, 2015).

Com o problema da agricultura na dependência dos agrotóxicos, pesquisadores afirmam que cerca de vinte e cinco milhões de trabalhadores rurais estão expostos aos riscos dos agrotóxicos, no entanto, os consumidores que estão distantes da área de produção, são expostos de maneira indireta com o consumo dos alimentos e água contaminada. De acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), em estudo realizado nos 26 estados brasileiros, um terço dos alimentos consumidos pelos brasileiros está contaminado por agrotóxicos (FERREIRA, 2015).

Os principais sintomas de intoxicações são: fraqueza, mal estar, dor de cabeça, dor de estômago, sonolência, suor abundante, visão turva, salivação excessiva, pupilas contraídas, vômito, dificuldade respiratória, convulsões, hemorragias, tumores malignos e lesão cerebral. Alguns efeitos na saúde a longo prazo tem sido avaliados, como: doença respiratória, a exemplo da asma; perda de visão, decorrente de degeneração da retina; doença de Parkinson, doença degenerativa neurológica; artrite reumatoide e outras doenças autoimunes; problemas para a reprodução, incluindo efeitos na fertilidade e nos ciclos de reprodução; e câncer. Como forma de prevenção dos danos causados pelos agrotóxicos as empresas produtoras de agroquímicos informam os agricultores o grau de toxicidade destes produtos através da identificação da cor da faixa presente no rótulo de sua embalagem, de acordo com a Tabela 1. (SILVA *et al.*, 2015; FERREIRA, 2015).

O desenvolvimento da agricultura no Brasil teve início na década de 1940 onde surgiram os primeiros registros de defensivos agrícolas. Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos teve um crescimento de 93%, enquanto o mercado nacional cresceu 190%. Atualmente, o país é

considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, logo é o país que mais recolhe embalagens de agrotóxicos vazias (80%), de acordo com o Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias (INPEV). Os estados de São Paulo, Mato Grosso e Paraná são os recordistas na devolução destes resíduos sólidos (SILVA *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a DL50.

Classes	Grupos	DL 50 (mg/kg)	Cor da faixa
I	Extremamente tóxicos	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxicos	5 - 50	Amarela
III	Medianamente tóxicos	50 - 500	Azul
IV	Pouco tóxicos	500 - 5000	Verde

Fonte: adaptado; OPAS, 1997.

2.3 LAGARTA *Spodoptera frugiperda*

Conhecer o ambiente favorável ao desenvolvimento da espécie de *S. frugiperda* é crucial para a elaboração do controle desta praga. O fator principal para evolução desta lagarta no ambiente é a temperatura, que influencia todas as fases do ciclo biológico. O aumento do número de indivíduos ocorre em condições de tempo seco e chuvas abundantes. Com uma temperatura média de 25° C o ciclo da *S. frugiperda* é de 30 dias. Geralmente a fase de pupa ocorre no solo, preferencialmente solos arenosos, porém, em outros tipos de solos, esta fase pode acontecer na planta do milho (VALICENTE *et al.*, 2008; SARMENTO *et al.*, 2012).

De acordo com Sarmiento *et al.* (2012) o intervalo de pré-ovoposição é em torno de 3 a 7 dias, sendo o período larval de 12 a 24 dias, considerando a temperatura média de 22 °C. Em condições de laboratório, observaram que o ciclo biológico da lagarta diminui quando exposta a temperaturas mais altas e eleva-se em temperaturas mais baixas. Ainda segundo a mesma equipe, a temperatura ideal para o desenvolvimento da *S. frugiperda* é de 25°C completando um ciclo de vida de 30 dias, em condições de laboratório de 14 horas de fotofase, 80 a 90% de umidade relativa.

Os adultos de *S. frugiperda* são de hábitos noturnos, a cópula ocorre à noite, as mariposas depositam seus ovos na superfície superior das folhas. O número de ovos por postura pode variar entre 100 a 200 ovos, sendo que, a mesma pode colocar entre 1500 a 2000

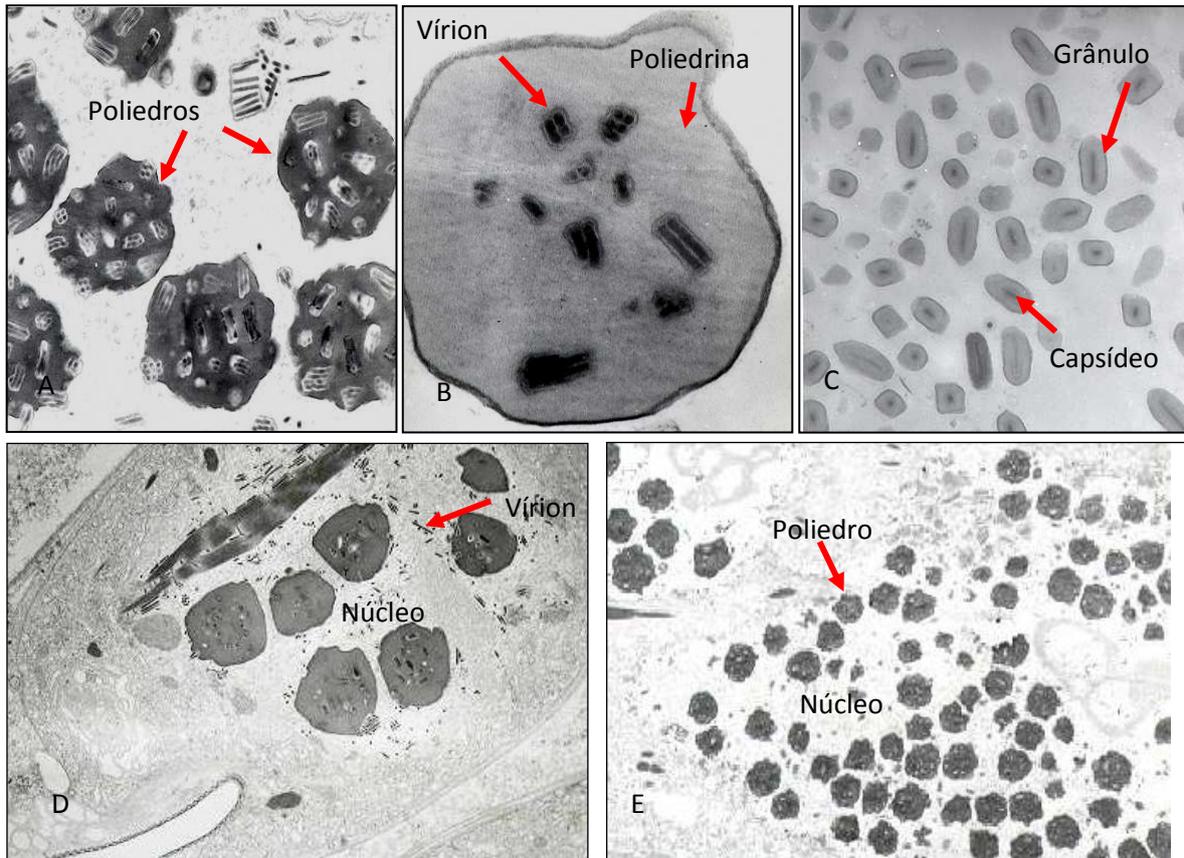
ovos durante o período de vida. Passados três dias em média ocorre a eclosão dos ovos. As lagartas recém nascidas se alimentam das folhas jovens do milho (VALICENTE e TUELHER, 2009, SARMENTO *et al.*, 2012).

2.4 BACULOVÍRUS

Em face ao intenso uso de produtos químicos para o controle da lagarta do cartucho do milho, o controle biológico com entomopatógenos se tornou uma opção viável em relação a preservação do meio ambiente. O uso do baculovírus como agente de controle pode ser eficaz no controle da *S. frugiperda* se utilizado de maneira correta. Algumas características o tornam adequado ao uso em pragas na agricultura, como sua especificidade, pois são compatíveis com outros inimigos naturais e utilização desses bioinseticidas não polui rios, nascentes, não possui efeito tóxico sobre aplicadores e pode agregar valor ao produto final (GERK; KITAJIMA; SOUZA, 1997, MOSCARDI e SOUZA, 2002, VALICENTE e TUELHER, 2009).

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*, composta de vírus com uma simples fita dupla circular de DNA, que contém gêneros: os nucleopoliedrovírus (VPN) e os granulovírus (VG). Todos os baculovírus têm uma mesma estrutura básica, um capsídeo coberto de forma arredondada. O nucleocapsídeo é um “core” cilíndrico de DNA e proteína. Dentro dele, a fita dupla de DNA associa-se heterogeneamente com uma proteína básica e forma um “core” cilíndrico. O gênero VPN é caracterizado por possuir dois subgêneros: “Vírus de Simples Nucleocapsídeo” - SNPV, onde apenas um capsídeo é encontrado por envelope e aqueles chamados de “Vírus de Múltiplos Nucleocapsídeos” - MNPV, no qual vários nucleocapsídeos são encontrados em um envelope comum. Os VGs tem apenas um capsídeo por envelope, possuem as oclusões virais na forma de grânulo, contendo um e raramente dois ou mais vírions por grânulo, como é mostrado na Figura 1.

Figura 01 - Micrografia eletrônica de tecido de lagartas do cartucho infectadas, experimentalmente.



(A) e (B): infecção por um isolado de nucleopoliedrovírus (MVPN), podendo-se observar os poliedros, os vírions e a matriz protéica de poliedrina. Notar que vários nucleocapsídeos estão envolvidos por uma membrana comum; (C): granulovírus (VG), onde se é observado apenas um capsídeo por envelope protéico; (D) e (E): tecidos infectados por nucleopoliedrovírus, podendo-se observar células contendo em seus núcleos vírions e poliedros.

Fonte: VALICENTE & TUELHER, 2009.

A oclusão das partículas virais em matriz proteica é uma característica extremamente importante. É o que garante proteção e possibilita a transmissão horizontal do vírus, ou seja, de um inseto para outro. As oclusões virais, portanto, são estruturas de resistência permitindo que os vírus mantenham a infectividade mesmo fora do hospedeiro. Além disso, é o que permite a obtenção de formulações de bioinseticidas que podem ser armazenados até serem utilizados para o controle de pragas no campo (CASTRO *et al.*, 1999, MOSCARDI e SOUZA, 2002, VALICENTE e TUELHER, 2009).

A lagarta do cartucho ao se alimentar da folha do milho contendo as partículas de baculovírus, infecta-se através da penetração dos corpos virais no sistema digestivo. O pH alcalino presente no intestino médio da lagarta quebra a matriz proteica de proteção do vírus, liberando os vírions, onde suas proteínas se ligam às proteínas presentes nas membranas das células epiteliais do intestino. Os nucleocapsídeos se deslocam pelo citoplasma celular,

penetram no núcleo da célula, onde liberam o DNA viral, iniciando a transcrição dos genes e replicação do genoma do vírus. Esta é considerada a fase primária de infecção, pois são formados apenas nucleocapsídeos e não são formados corpos oclusos (matriz proteica). Os nucleocapsídeos passam através da membrana celular e penetram na membrana das outras células ocorrendo a formação de um envelope novo. Nessa fase, são chamados de “budded vírions” (BVs), que se distinguem dos vírions derivados dos corpos virais por suas características morfológicas e a presença de proteínas específicas aos BVs. Os BVs, então, atingindo a hemolinfa e o sistema traqueal do inseto, espalham-se e provocam infecções secundárias em outros tecidos do hospedeiro. Nas células desses tecidos, ocorre a formação de BVs que se disseminam de célula para célula. Em estágios avançados da infecção, há a formação de corpos virais, nos quais ocorre a oclusão dos vírions. Gradativamente, os núcleos das células infectadas tornam-se repletos de corpos virais, havendo a ruptura das membranas celulares e a liberação de grande quantidade de corpos virais na hemolinfa do hospedeiro. No processo de infecção, o inseto é debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação, se deslocando para as partes superiores da planta hospedeira, onde morre em 5 a 8 dias, apresentando o corpo descolorido (rosa-esbranquiçado) em relação à lagarta sadia, como representado na Figura 02. Dois dias após a morte da lagarta, o corpo do inseto se rompe, liberando grande quantidade de vírus sobre partes da planta. Dessa forma, lagartas infectadas ou mortas servem de inóculo para a transmissão horizontal do vírus, por meio da chuva e do movimento de artrópodes nas plantas, bem como pela predação e parasitismo em insetos infectados (MOSCARDI e SOUZA, 2002; SECCHI, 2002).

Figura 02 - Lagarta infectada pelo baculovírus.



Fonte: Do autor, 2015.

Existem quatro estratégias principais para o uso de baculovírus em campo, para o controle de pragas: 1) Introdução e Colonização, em que a introdução de um baculovírus é feita em uma região onde ele não ocorre naturalmente com o objetivo de seu estabelecimento no ambiente do hospedeiro e seu controle permanente (controle biológico clássico); 2) Introdução Inoculativa, em que o patógeno é aplicado e se multiplica e se dissemina eficientemente no ambiente controlando o inseto hospedeiro por mais de uma geração, mas podendo ser reaplicado se necessário; 3) Manipulação do Ambiente, em que a ocorrência natural de um vírus é aumentada por intervenção do homem, por meio de práticas culturais que beneficiam o aumento de baculovírus em populações do inseto hospedeiro; e 4) Inseticida Microbiano, em que um vírus é aplicado quantas vezes necessário, nos moldes de um inseticida químico, para manter a praga hospedeira abaixo de níveis de dano econômico para a cultura atacada. Esta é a estratégia mais utilizada para o controle de pragas em campo por baculovírus (MOSCARDI e SOUZA, 2002).

A produção de SfMNPV em larga escala enfrenta sérios problemas, e o mais importante estão relacionados à produtividade, visto que, há rompimento do tegumento da *S. frugiperda* na morte das lagartas infectadas pelo vírus, culminando com uma perda de partículas virais significativas, o que acarreta prejuízo na produção. Com a descoberta do isolado 6NR em Cascavel, PR, por pesquisadores da Embrapa de Milho e Sorgo, este problema foi reduzido, pois o isolado não rompe o tegumento da lagarta impedindo a perda de material viral, tornando mais viável a produção de *B. spodoptera* (VALICENTE *et al.*, 2008).

3 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos das soluções de pH e temperatura sobre o SfMNPV e sua efetividade contra *Spodoptera frugiperda*.

REFERÊNCIAS

- CASALI, A. L. *et al.* Nível de capacitação e informação dos operadores de máquinas para a aplicação de agrotóxicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.3, p.425-431, mar, 2015.
- CASTRO, M. E. B. *et al.* Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.10, p.1733-1761, out. 1999.
- DOMINGUES, M. R. *et al.* Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 25, p. 45-54, jan./dez. 2004.
- FARIAS, P. R. S. Spatial Analysis of the Distribution of *Spodoptera frugiperda* and Losses in Maize Crop Productivity Using Geostatistics. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 3, mai-jun. 2008.
- FERREIRA FILHO, J.B.S., *et al.* Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. Campo Grande, Brasil, julho 2010.
- FERREIRA, M. L. P. C. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. **Revista de Direito Sanitário**, São Paulo v.15 n.3, p. 18-45, fev. 2015.
- FIGUEIREDO, M. de L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1693-1698, dez. 2006.
- GERK, A. O.; KITAJIMA, E. W.; SOUZA, M. L. Identificação e Caracterização de Isolado Brasileiro do Vírus de Poliedrose Nuclear da Lagarta do Cartucho-do-Milho. **Anal Sociedade Entomologia do Brasil**, v. 26, n. 3, dez. 1997.
- LOPES, G.S., *et al.* Biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) em folhas de mandioca (*Manihot esculenta*, CRANTZ). **Revista Caatinga**, v.21, n.3, p.134-140, Mossoró, Brasil julho/setembro 2008
- MOSCARDI, F., SOUZA M.L.. Baculovírus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. nº 24- janeiro/fevereiro 2002.
- SARMENTO, R.A, *et al.* Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spoptera frugiperda* (Lepdoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Journal Bioscience**, v.18, n. 2, p. 41-48, dezembro 2012.
- SECCHI, V. A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.**, Porto Alegre, v.3, n.3, jul-set 2002.
- SILVA, F. M. da *et al.* Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma visão bibliográfica. **Intesa**, v. 9, n. 1, p. 77-86, jan-jun. 2015.

VALICENTE, F.H., *et al.* A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.1, p. 77-82, 2008.

VALICENTE, F.H., *et al.* Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, janeiro 2013.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, dez. 2009.

VIEIRA, C.M, *et al.* Characterization of a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 111, p. 189–192, 2012.

CAPÍTULO 2

INTERFERÊNCIA DAS SOLUÇÕES COM DIFERENTES AJUSTES DE pH NO SfMNPV E SUA VIRULÊNCIA PARA LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda*

RESUMO

Devido à facilidade em que são encontrados na natureza os baculovírus são mais estudados permitindo a manutenção da taxa populacional de insetos abaixo do nível de dano econômico. Devido a sua eficácia no combate a lagarta do cartucho, torna-se importante analisar interferências das soluções de pH associadas ao comportamento do SfMNPV no meio ambiente para o combate da lagarta *Spodoptera frugiperda*. O inóculo do isolado 6 de baculovírus foi determinado por meio da metodologia de contagem de poliedros em câmara de Neubauer. Para obtenção das soluções com diferentes pH, utilizou-se ácido ascórbico 0,5% g/v, ácido ascórbico 0,0125% g/v, ácido acético 0,1% v/v, ácido clorídrico 0,01% v/v, pH 7 e pH 10. Cada amostra na concentração de 2×10^6 pol/mL foi adicionado nas soluções de pH testadas. Para a alteração de carga bacteriana foram analisadas cinco amostras de baculovírus com as soluções ácidas, tampão 7 e 10. Na determinação da carga bacteriana, as amostras foram analisadas pela técnica Pour Plate. Para a análise da viabilidade do vírus, 50 lagartas de cinco dias foram inoculadas com o vírus. Após 48 horas de inoculação, somente 25 lagartas foram individualizadas em recipiente com dieta artificial e mantidas até morrerem pelo baculovírus. As soluções ácidas (ácido ascórbico 0,5% g/v, ácido acético 0,1% v/v e ácido clorídrico 0,01% v/v), quando comparadas com o tratamento controle, apresentam significativa queda de poliedros. Os dados de mortalidade de lagartas e contagem de poliedros a partir do tratamento com solução de ácido ascórbico 0,0125% g/v, não diferiram da amostra controle. A solução tampão de pH 10, apresentou redução de 97% das partículas virais. O teste de mortalidade demonstrou que a solução tampão de pH 10 não deve ser utilizada, por diferir significativamente das outras soluções testadas. Notou-se que todos os ácidos testados obtiveram eficiência bacteriana superior a 90%. O tratamento com a solução de pH 7, apresentou um crescimento bacteriano de 37,20%. As soluções ácidas foram satisfatórias na análise da eficiência bacteriana apresentando valores superiores a 90% de redução. As mesmas soluções ácidas proporcionaram efeito de aglomeração das partículas virais, alterando a homogeneidade da amostra, reduzindo a contagem de poliedros. Os ácidos testados mantiveram a viabilidade do vírus resultando na mortalidade acima de 80% das lagartas de *S. frugiperda*. A solução de ácido ascórbico 0,0125%, mostrou ser a mais promissoras das amostras testadas.

Palavras chave: Ácidos, Baculovírus, pH.

ABSTRACT

Because of the ease in which they are found in nature are the most studied baculovirus allowing the maintenance of the rate of insects below economic injury level. Because of their effectiveness in combating armyworm, it becomes important to analyze the interference pH solutions SfMNPV behavior associated with the environment for combating caterpillar *Spodoptera frugiperda*. The inoculum isolated 6 baculovirus was determined by counting methodology polyhedra in a Neubauer chamber. To obtain solutions with different pH was used ascorbic acid 0.5% g / v% ascorbic acid 0.0125 g / v, 0.1% acetic acid v / v hydrochloric acid 0.01% v / v , pH 7 and pH 10. Each sample at a concentration of 2×10^6 in / ml was added in the tested solutions of pH. For bacterial load change five samples were analyzed baculovirus with acidic solutions, buffer 7 and 10. In the determination of bacterial burden, the samples were analyzed by pour plate technique. For the analysis of virus viability, 50 caterpillars five days were inoculated with the virus. After 48 hours of inoculation, only 25 caterpillars were individualized container with artificial diet and kept until they died by the baculovirus. The acid solutions (ascorbic acid 0.5% g / v acetic acid 0.1% v / v hydrochloric acid 0.01% v / v) compared with the control treatment, showed a significant decrease of polyhedra. Tracked mortality data and polyhedra count from the treatment with ascorbic acid solution 0.0125% g / v, did not differ from control sample. The pH 10 buffer solution was reduced by 97% of the viral particles. The mortality test showed that at pH 10 buffer solution should not be used to significantly differ from other solutions tested. It was observed that all the tested acids obtained superior efficiency 90% bacterial. The treatment with the solution of pH 7, a bacterial growth showed 37.20%. The acid solutions were satisfactory in the analysis of the bacterial efficiency with values greater than 90% reduction. The same acidic solution provided the effect of agglomeration of virus particles, altering the homogeneity of the sample, reducing the polyhedra count. The acids tested maintained the viability of the virus resulting in over 80% mortality of *S. frugiperda* larvae. The ascorbic acid solution 0.0125%, has proven to be the most promising of the samples tested.

Keywords: Acids, baculovirus, pH.

1. INTRODUÇÃO

O interesse em desenvolver os baculovírus em inseticida biológico existe há mais de 40 anos. Estes vírus são os mais estudados devido à facilidade em que são encontrados na natureza, permitindo pelo seu uso, a manutenção da taxa populacional de insetos abaixo do nível de dano econômico (PESSÔA, 2012).

O efeito de vírus entomopatogênicos e suas reações sobre organismos como, os seres humanos e animais vertebrados estão bem definidas em literatura. De acordo com Pessôa, 2012, mais de vinte espécies de vertebrados, incluindo o homem, foram expostos a estes tipos de vírus, não sendo relatados casos de reações tóxicas ou patogênicas em animais vertebrados, colocando-o como adequado ao uso como agentes de controle biológico.

Os baculovírus possuem algumas vantagens sobre os inseticidas químicos, como sua alta especificidade em relação ao hospedeiro, sem serem prejudiciais aos insetos benéficos, podem ser produzidos no próprio hospedeiro e possibilita seu uso em programas de manejo integrado de pragas (MIP) (CAMACHO; GOMEZ e VILLAMIZAR, 2013).

No Brasil, o uso do baculovírus no controle de pragas está presente em algumas culturas como soja, milho e mandioca. Apesar do baculovírus ser eficiente no controle de diferentes insetos, sua eficiência no campo é inconsistente, influenciada provavelmente, por fatores ambientais, como temperatura, radiação solar, pH, alta umidade e presença de agentes contaminantes (RUIZ, 2015).

O pH é um importante fator de estabilidade da formulação de baculovírus, considerando que as partículas virais são destruídas quando expostas a valores de pH alcalino (9,5-11,5), a taxa ideal para a formulação a base de baculovírus deve ser próxima a neutralidade para garantir a integridade da estrutura que protege o vírion (CAMACHO; GOMEZ e VILLAMIZAR, 2013, RUIZ, 2015).

A determinação da concentração de contaminantes em um bioinseticida é muito importante, pois um número elevado de microrganismos afeta a viabilidade ou integridade da substância ativa e a sua atividade biológica, podendo representar um risco para a saúde humana e para o meio ambiente. Nos Estados Unidos o teor de poluentes permitido para formulação à base de baculovírus é de até 10^8 UFC/g do produto. Com elevados níveis de carga microbiana no inóculo (lagartas infectadas) utilizado como ingrediente ativo na formulação, torna-se essencial a redução do número de contaminantes com o uso de lagartas saudáveis, antes de serem expostas ao vírus. A higiene rigorosa das mãos e o recolhimento

adequado das lagartas infectadas, antes que ocorra a lise celular podem facilitar a redução da contaminação por organismos saprófitas (RUIZ, 2015).

2 OBJETIVO GERAL

Analisar interferências das soluções com diferentes ajustes de pH associadas ao efeito do SfMNPV no meio ambiente para o combate da lagarta *Spodoptera frugiperda*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a viabilidade do SfMNPV, quando submetido a soluções de pH: ácidas (ácido ascórbico, ácido acético e ácido clorídrico), neutra (tampão de pH 7) e alcalina (tampão de pH 10).

Identificar a solução ácida mais favorável para o tratamento do inóculo do SfMNPV, visando maior eficiência na redução da contaminação bacteriana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos do Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas (ICTE) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), na cidade de Uberaba, no Estado de Minas Gerais - Brasil.

3.1 CRIAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*

As pupas de *S. frugiperda* foram cedidas pelo Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPMS/Embrapa), no município de Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais, Brasil.

As mariposas de *S. frugiperda* emergidas foram colocadas em gaiolas de PVC de 60 cm de altura e 250 mm de diâmetro (Figura 3), contendo papéis chamex para a oviposição e alimentados com solução de sacarose 10% e ácido ascórbico 0,1% dispostas em copos descartáveis de 50 mL. Os ovos foram recolhidos e colocados em sacos plásticos transparentes até a eclosão das lagartas. As lagartas recém eclodidas foram transferidas para dieta artificial, elaborada segundo Valicente e Barreto (2003) e mantidas a 25°C. Aos sete dias, as lagartas foram individualizadas em recipientes descartáveis de 50 mL com dieta, de modo a dar continuidade ao ciclo normal da espécie e gerar adultos (mariposas).

Figura 03 - Gaiola em PVC das mariposas de *Spodoptera frugiperda*.



Fonte: Do autor, 2015

3.2 MULTIPLICAÇÃO DE SfMNPV

Para a produção de SfMNPV, folhas de milho foram submergidas em solução de hipoclorito na concentração de 100 mL (ClO^-)/5000mL e deixadas em repouso por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens com água purificada para a retirada do hipoclorito da superfície das folhas.

O inóculo inicial do isolado 6 de vírus foi cedido pelo Dr. Fernando Hercos Valicente (Embrapa), Sete Lagoas - MG, pois esse isolado causa alta mortalidade da lagarta-do-cartucho e alta produção viral por lagarta. A suspensão de baculovírus na concentração de 2×10^6 poliedros/mL foi preparada e pulverizada com um pulverizador manual na superfície das folhas e o tratamento testemunha pulverizado apenas com água destilada. O surfactante não-iônico Tween 20[®] (Merck Schuchardt, Germany) (Polioxietileno-sorbitol, como dispersante) foi adicionado em todas as suspensões, garantindo maior dispersão dos poliedros na superfície das folhas. Posteriormente, lagartas de sete dias foram colocadas em vasilhas plásticas de 42 x 27cm sobre folhas de milho contendo *Baculovirus spodoptera*, mantidas em inoculação por 48 horas, para tentar minimizar os efeitos do canibalismo, que é um fator limitante num sistema de produção de baculovírus e foi significativo com lagartas de sete dias de idade, inoculadas com SfMNPV em folhas de milho, após um período de inoculação de 72 horas (VALICENTE *et al.*, 2013). As lagartas foram individualizadas em recipientes descartáveis de 50mL com dieta artificial (Figura 4), como a descrita por Valicente e Barreto (2003), e mantidas até ocorrência de sua morte entre 5 a 10 dias da inoculação. O material viral coletado foi armazenado em freezer a -18°C para inibir crescimento de microrganismos.

Figura 04 - Lagarta individualizada após ingestão do baculovírus e lagartas mortas infectadas.



Fonte: Do autor, 2015

3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As cinco amostras trabalhadas foram recolhidas de forma aleatória da produção piloto da empresa Vitae Rural Biotecnologia no período de três meses.

Para cada amostra, foram pesados 2 g de lagartas infectadas por baculovírus. Com auxílio de um cadinho e pistilo as lagartas foram maceradas e coadas em tecido "voil" com 10 mL de água purificada. O inóculo gerado foi colocado em tubo Falcon de 15 mL e a concentração de vírus determinada por meio da metodologia de contagem de poliedros.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE POLIEDROS

Para quantificação do número de poliedros de cada amostra, realizou-se uma diluição seriada, sendo:

1º tubo - Pipetado 1 mL de cada amostra do inóculo puro em 9 mL de água purificada.

2º tubo - Do tubo 1 foi recolhido 1mL de inóculo e transferido para 9mL de água purificada no tubo 2;

3º tubo - Do tubo 2 foi recolhido 1mL de inóculo e transferido para 9mL de água purificada no tubo 3;

Em todas as etapas, os tubos foram agitados para homogeneização. O inóculo diluído foi colocado na Câmara de Neubauer, sendo a contagem de poliedros realizada para cada amostra.

3.5 TESTE DE pH COM SfMNPV

Soluções com pH ácidos, neutro e básico foram preparadas previamente e acrescidas de SfMNPV na concentração de 2×10^6 poliedros/mL.

3.5.1 Teste com diferentes soluções de pH

Para obtenção das soluções ácidas foram utilizados três ácidos diferentes, sendo: ácido ascórbico 0,5% g/v (pH 2,87), ácido ascórbico 0,0125% g/v (pH 3,25), ácido acético 0,1% v/v (pH 3,40) e ácido clorídrico 0,01% (pH 3,16). Para o pH 7 e pH 10 foram utilizadas soluções tampão de calibração para pHâmetro, compostos por fosfato de potássio e hidróxido de sódio.

O inóculo de baculovírus de cada amostra na concentração de 2×10^6 pol/mL foi adicionado nas soluções de pH testadas. Cada suspensão com os diferentes pH foi mantida em repouso por 30 minutos a 25°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 2 minutos. Na solução resultante, observou-se duas fases bem definidas, sobrenadante e precipitado (contendo a maioria dos corpos virais presentes na amostra). As fases foram separadas em tubos independentes, o precipitado ressuspenso em 10 mL de água purificada mantendo o volume de solução utilizado no início do processo. A contagem de poliedros do precipitado e sobrenadante da solução foi definida em câmara de Neubauer, as concentrações comparadas com a amostra controle contendo a solução do baculovírus e água purificada. Realizou-se 4 repetições de cada amostra e os resultados foram analisados e comparados estatisticamente.

3.5.2 Análise bacteriana

Para a alteração de carga bacteriana foram analisadas cinco amostras de baculovírus com as soluções ácidas, tampão 7 e 10, através da técnica de Pour Plate. Nos intervalos de tempo de 15 e 30 minutos, uma alíquota de 1 mL de cada solução foi diluída de forma seriada, inoculada em placa de Petri contendo Plate Count Agar (PCA) e incubadas a 37° C por um período de 24 a 48 horas. Após este período, realizou-se a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) e analisada a eficiência do processo de desinfecção bacteriana pela utilização da variação de pH.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ UFC (controle)} - n^{\circ} \text{ UFC (final)}}{n^{\circ} \text{ UFC (controle)}} * 100$$

3.5.3 Análise da viabilidade do SfMNPV após submissão aos tratamentos em soluções com diferentes concentrações de pH

1- Preparação das folhas de milho

As folhas de milho foram colhidas e submergidas em água purificada com hipoclorito na concentração de 100 mL (ClO⁻)/5000mL por 20 minutos. Em seguida, realizou-se o enxague das folhas por quatro vezes.

2- Seleção de lagartas

50 lagartas com idade de cinco dias foram selecionadas para cada tratamento com as soluções de pH e o controle.

3- Inoculação das lagartas com SfMNPV.

O volume de 30 mL do inóculo foi pulverizado na superfície das folhas de milho para cada teste, e após uma breve secagem, 50 lagartas de cinco dias foram inoculadas. As folhas foram colocadas inteiras nas vasilhas para teste e sem secar totalmente, evitando que prejudique a ingestão das folhas pelas lagartas. Após 48 horas de inoculação, 25 lagartas de cada vasilha foram coletadas aleatoriamente e armazenadas em copos descartáveis de 50 mL contendo dieta artificial e mantidas até morrerem pelo baculovírus. Para o controle do teste, foi pulverizado nas folhas de milho somente o inóculo feito em água purificada, e assim aplicada a metodologia descrita anteriormente. Foram realizadas quatro repetições para cada amostra.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os resultados foram analisados pelo programa Statistica 10.0. Os dados obtidos nos testes com os pHs e temperaturas foram submetidos ao teste de análise de variância seguida do teste de comparação de médias ($\alpha = 0,05$).

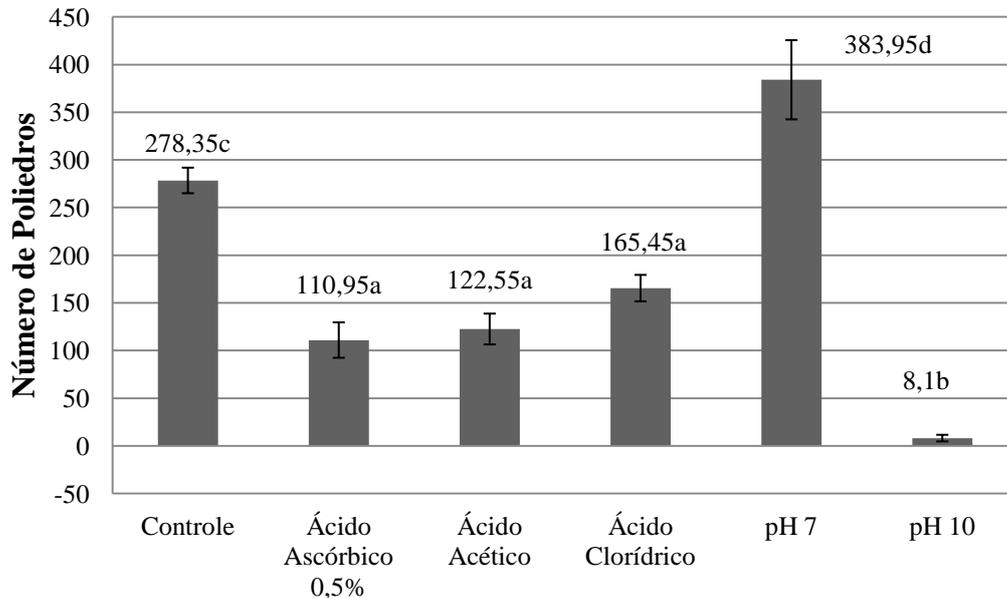
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos com as soluções de diferentes níveis de pH no qual os poliedros de SfMNPV foram submetidos, apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle (inóculo de baculovírus com água) (Figura 5). As soluções ácidas (ácido ascórbico 0,5% g/v (pH 2,87), ácido acético 0,1% v/v (pH 3,40) e ácido clorídrico 0,01% v/v (pH 3,16), não diferenciaram entre si, tendo como médias de números de poliedros (110, 122, e 165), respectivamente. Porém, quando comparadas com o tratamento controle (278), apresentam significativa queda de poliedros, como demonstra na Figura 5. Camacho, Gomez e Villamizar (2013), relatam que a integridade física dos poliedros é afetada quando exposta a valores de pH menores que 4.

A solução tampão de pH 10, afetou a média da contagem de vírus quando comparada com o controle, apresentando redução de 97% das partículas virais (8 e 278, respectivamente) (Figura 5). Os baculovírus são extremamente sensíveis a soluções básicas, explicando a queda significativa de poliedros quando submetidos ao tampão de pH 10. Camacho, Gomez e Villamizar (2013), relatam que a integridade física dos poliedros é afetada quando exposta a valores de pH maiores que 9.

A solução tampão de pH 7, apresentou média de contagem de poliedros superior a contagem do controle, na ordem de 383 para 278 poliedros, respectivamente (Figura 5). O aumento do número médio de poliedros no tampão de pH 7, é devido a elevação da contagem de bactérias da solução, pois pH 7 é considerado o pH ideal para crescimento bacteriano (HOFFMANN, 2001). A contagem de poliedros na câmara de Neubauer não é uma metodologia precisa, podendo gerar erros significativos, principalmente devido ao grande acúmulo de matéria orgânica e microrganismos presentes no inóculo de baculovírus, que é o composto orgânico principal de todo o estudo.

Figura 5 - Número de poliedros de SfMNPV após tratamento com as soluções de pH.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

O pH é um importante fator de estabilidade da formulação de baculovírus, considerando que as partículas virais são destruídas quando expostas a valores de pH alcalino (9,5-11,5), a taxa ideal para a formulação a base de baculovírus deve ser próximo a neutralidade para garantir a integridade da estrutura que protege o vírion. Como a produção de nucleopoliedrovírus normalmente é realizada através do próprio hospedeiro (*Spodoptera frugiperda*), ocorre a contaminação de microrganismos do extrato bruto de vírus a partir da microbiota normal da lagarta, gerando uma instabilidade no armazenamento da formulação a base de baculovírus (RUIZ, 2015).

Teste de variância ANOVA one-way (Tabela 2) Controle x Ácido ascórbico 0,0125% g/v não tem significância estatística ($P > 0,05$), o que indica que não houve diferença na contagem de poliedros entre controle e ácido ascórbico 0,0125%. Com isto, esta solução de ácido ascórbico 0,0125% g/v foi adicionada ao teste de mortalidade em vivo de lagartas de *S. frugiperda*.

Tabela 2 - Análise de variância para o efeito da solução de Ácido Ascórbico 0,0125% g/v na exposição ao SfmNPV.

Fonte de Variação	Contagem de Poliedros	
	F	P
Ácido Ascórbico 0,0125%	3,87	0,064

* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

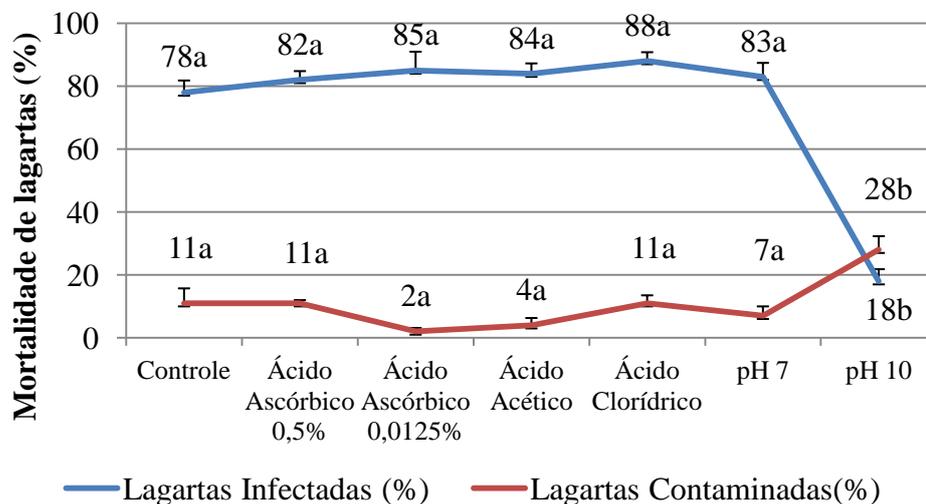
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

O teste de mortalidade realizado com as soluções de pH, não foi influenciado pelo canibalismo entre as lagartas de *S. frugiperda*, pois foram mantidas de modo coletivo por pouco tempo (48 horas). O fato de se utilizar 50 lagartas para o procedimento de inoculação e individualizar apenas 25 para a análise de mortalidade, demonstra a preocupação em minimizar os efeitos do canibalismo sobre as amostras testadas. Valicente e equipe (2013), demonstraram que o canibalismo de lagartas *S. frugiperda* de sete dias de idade foi significativo após o período de inoculação de SfmNPV por 72 horas em folhas de milho.

O teste de mortalidade da lagarta do cartucho a partir da inoculação de baculovírus em diferentes soluções de pH, demonstrou que a solução tampão de pH 10 diferiu significativamente das outras soluções testadas, o que condiz com os resultados apresentados na contagem do número de poliedros após o mesmo tratamento, como representado na Figura 6.

As soluções controle, ácido ascórbico 0,5% g/v, ácido ascórbico 0,0125% g/v, ácido acético, ácido clorídrico e solução tampão de pH 7, não obtiveram diferença importante na mortalidade das lagartas pelo vírus (Figura 6).

Figura 6 - Mortalidade de *S. frugiperda*, após inoculação de SfmNPV tratados com soluções de diferentes pH.



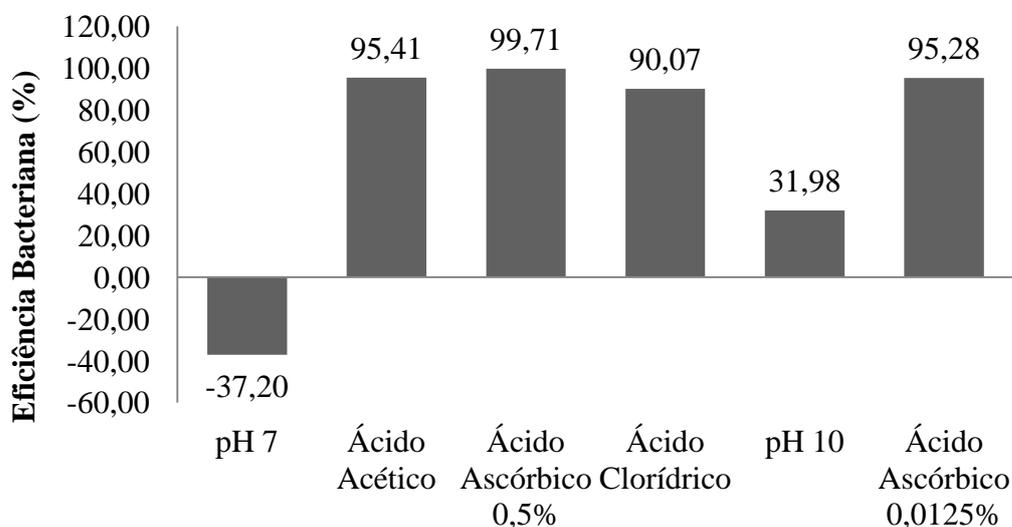
Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

Os resultados de mortalidade dos ácidos ascórbico 0,5% g/v, ácido acético e ácido clorídrico foram acima de 80% (82, 84 e 88, respectivamente), não condizem com os dados obtidos de contagem de poliedros após estes tratamentos, onde apresentaram uma queda importante de seus valores, em comparação ao tratamento controle (Figura 6). O resultado proveniente da solução tampão de pH 7, foi coerente com a contagem de poliedros, obtendo valor de mortalidade de *S. frugiperda* superior a 80% (Figura 7). O aumento da contagem bacteriana demonstrado na Figura 5, não interferiu na infecção das lagartas pelo vírus, além de apresentar apenas 7% de lagartas contaminadas por outros microrganismos senão o baculovírus (Figura 7).

Os dados de mortalidade de lagartas a partir do tratamento com solução de ácido ascórbico 0,0125% g/v, acompanharam a análise de contagem de poliedros, onde não diferiram significativamente da amostra controle, além de apresentar o menor índice de mortalidade das lagartas contaminadas, apenas 2% (Figura 7).

A Figura 7 demonstra os resultados da eficiência bacteriana no inóculo de partículas virais de SfMNPV, após tratamento com diferentes soluções de pH. Notou-se que todos os ácidos testados obtiveram eficiência bacteriana superior a 90%. O tratamento com a solução de pH 7, apresentou um crescimento bacteriano de 37,20%, comprovando o que Hoffmann, 2001 relata, no qual pH 7 é considerado o ideal para o crescimento microbiano.

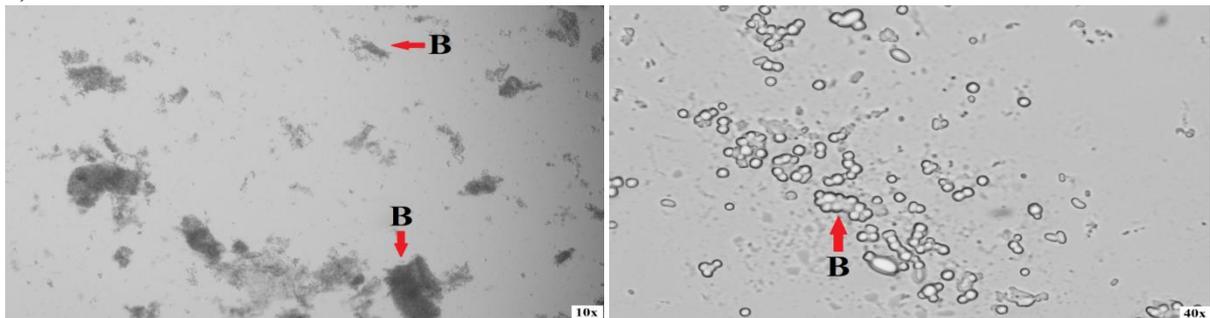
Figura 7 - Eficiência bacteriana no inóculo de SfMNPV após tratamento com diferentes soluções de pH.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015.

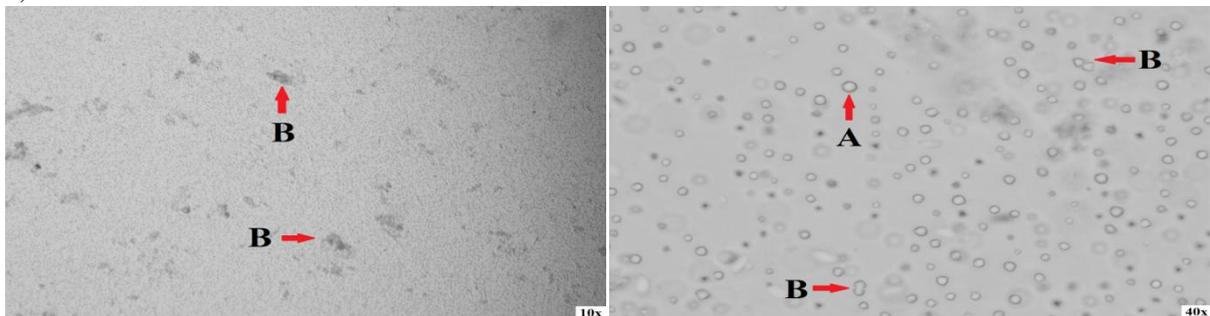
Com os dados obtidos da contagem do número de poliedros e mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* após tratamento do inóculo de baculovírus com soluções de variáveis pH, observou-se que apesar da queda contagem de poliedros dos ácidos (exceto ácido ascórbico 0,0125%), o teste de mortalidade das lagartas foi muito satisfatório, apresentando índices superiores a 80%. As Figuras 8A, 8B, 8C, revelam a presença de aglomerados de poliedros de baculovírus, caracterizando uma amostra heterogênea, impossibilitando uma distribuição normal dos poliedros na solução, como exemplificado na Figura 8D, cuja solução é somente o inóculo e água. Estes fatos explicam a queda dos números da contagem poliedros de baculovírus em câmara de Neubauer. Apesar da contagem de vírus a partir da solução de ácido ascórbico 0,0125% não ter tido diferença em comparação a amostra controle, a Figura 8E, mostra a presença de pequenos aglomerados de baculovírus, porém não prejudicaram significativamente a metodologia de contagem de vírus.

Figura 8A - Aglomerados de baculovírus (B) após tratamento com solução de ácido acético 0,1%



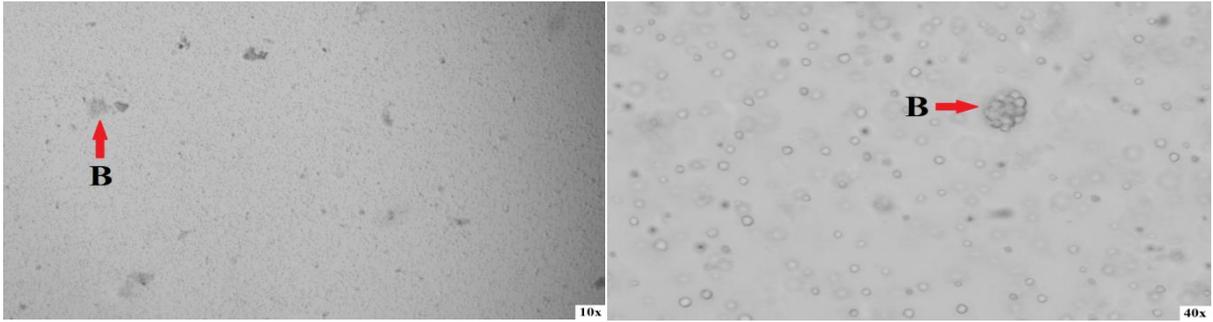
Fonte: Do Autor, 2015

Figura 8B - Aglomerados de baculovírus após tratamento com solução de ácido ascórbico 0,5%



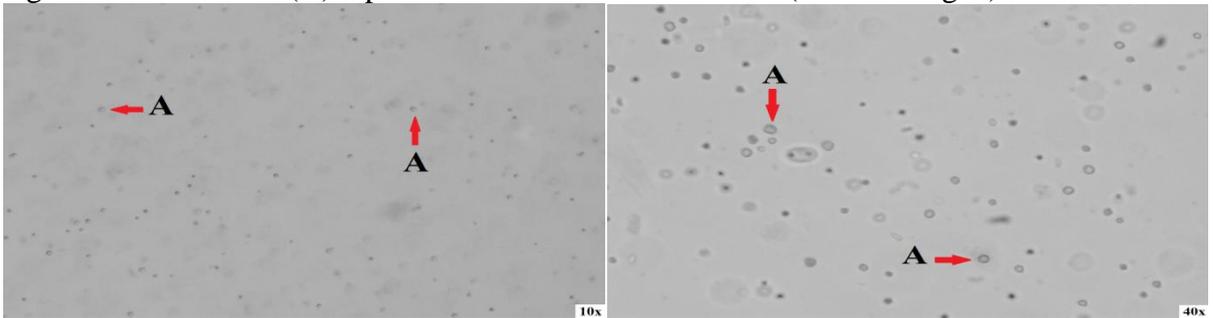
Fonte: Do Autor, 2015.

Figura 8C - Aglomerados de baculovírus (B) após tratamento com solução de ácido clorídrico 0,01%



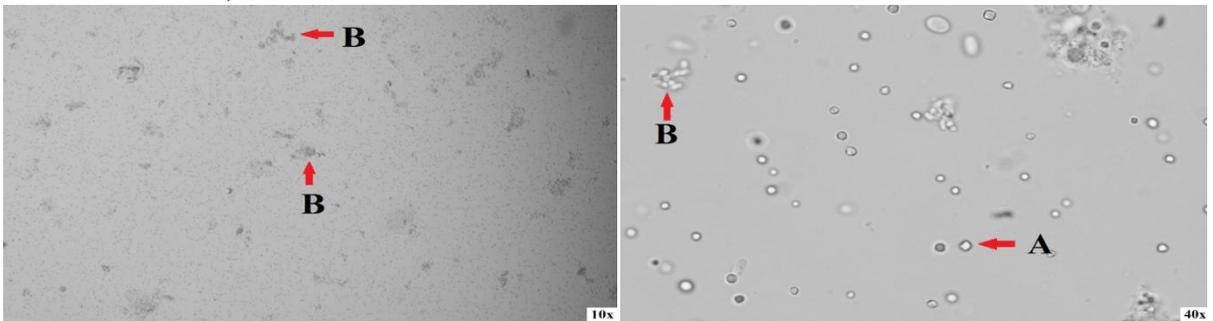
Fonte: Do Autor, 2015.

Figura 8D - Poliedros (A) representados na amostra controle (inóculo + água)



Fonte: Do Autor, 2015

Figura 8E: Poliedros (A) e aglomerados de baculovírus (B) após tratamento com solução de ácido ascórbico 0,0125%



Fonte: Do Autor, 2015.

5 CONCLUSÃO

As soluções de ácido ascórbico 0,5%, ácido acético e ácido clorídrico testadas no tratamento de inóculo de baculovírus, foram satisfatórias na análise da eficiência bacteriana apresentando valores superiores a 90% de redução.

As mesmas soluções ácidas proporcionaram efeito de aglomeração das partículas virais, alterando a homogeneidade da amostra, reduzindo a contagem de poliedros. Apesar deste efeito, os ácidos testados mantiveram a viabilidade do vírus resultando na mortalidade acima 80% das lagartas de *S. frugiperda*.

O *Baculovirus spodoptera* é sensível ao pH 10, danificando em 97% o número de partículas virais.

A solução de ácido ascórbico 0,0125%, mostrou ser a mais promissoras das amostras testadas, pois a contagem de poliedros após tratamento, foi a mesma da amostra controle, o teste de virulência obteve resultado de 85% de lagartas infectadas, além de estabelecer 95% de eficiência de redução bacteriana.

REFERÊNCIAS

- CAMACHO, J. E.; GÓMEZ, M. I.; VILLAMIZAR, L. F. Efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 12, n. 3, p. 437-450, jul.2013.
- HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, n. 9, jul-ago. 2001.
- PESSÔA, V. M. **Precipitações pluviométricas na eficiência do *Baculovirus Anticarsia gemmatalis* NPV na cultura da soja**. Universidade do Oeste Paulista. Tese de Mestrado, 2012.
- RUIZ, L. M. Q. **Uso de baculovirus como alternativa de control biológico de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maiz: una revisión conceptual y de avances en su aplicación**. Universidad Abierta y a Distancia. Tese de Mestrado, 2015.
- QUIROGA, I.; MARTHA GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n.1, p. 27-35, 2011.
- VALICENTE, F.H., BARRETO, M.R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 32, n. 4, p. 639-644, out - dez, 2003.
- VALICENTE, F.H., *et al.* Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, janeiro 2013.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O SfMNPV E SUA VIRULÊNCIA PARA LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda*

RESUMO

A temperatura afeta o ciclo de replicação dos baculovírus e o desenvolvimento da lagarta do cartucho do milho. Altas temperaturas do hospedeiro podem inibir a expressão do vírus e a alternância de temperaturas afeta a expressão do patógeno. Com isso, torna-se importante analisar interferências da temperatura associadas ao comportamento do SfMNPV no meio ambiente para o combate da lagarta *Spodoptera frugiperda*. O inóculo do isolado 6 de baculovírus foi determinado através da metodologia de contagem de poliedros em câmara de Neubauer. Alíquotas de 10 mL da solução de baculovírus, foram submetidas a 10, 25, 50, 60, 70 e 90°C. A contagem de poliedros foi realizada e as concentrações comparadas com a amostra controle (25°C). Para a análise da viabilidade do vírus, o volume de 30 mL do inóculo de baculovírus tratado nas temperaturas (10, 25, 50, 60, 70, 90°C, foi pulverizado na superfície das folhas de milho, e 50 lagartas de cinco dias foram inoculadas. Após 48 horas de inoculação, 25 lagartas de cada vasilha foram coletadas aleatoriamente e armazenadas em copos descartáveis de 50 mL contendo dieta artificial e mantidas até a morte pelo baculovírus. As variações de temperatura que o inóculo de SfMNPV foi submetido, afetaram o número de poliedros, quando comparados com os resultados obtidos a partir da temperatura de 25°C. As temperaturas de 50, 60, 70 e 90°C não apresentaram diferença quanto ao número de poliedros. A temperatura de 10°C foi a que mais diferiu das demais, apresentando queda do número de partículas virais ocorrendo aglomeração de poliedros. Os índices de mortalidade de lagartas infectadas não tiveram diferença nas temperaturas de 10, 25, e 50°C. A temperatura de 60°C houve uma queda na mortalidade de lagartas de 52%, sendo que 70 e 90°C, apresentaram índices de mortalidade de lagartas de 15 e 7%, respectivamente. O *Baculovirus spodoptera* resiste a temperatura de 10, 25 e 50°C, sem perder sua eficiência. As temperaturas de 60, 70 e 90°C danificam os poliedros de maneira progressiva com o aumento dos níveis de temperatura.

Palavras chave: Temperatura, Baculovírus, Resistência.

ABSTRACT

The temperature affects the replication cycle of baculoviruses and the development of corn armyworm. High temperatures host can inhibit the expression of the virus and the switching temperatures affects the expression of the pathogen. With this, it becomes important to analyze temperature related to the interference SfMNPV behavior in the environment for combating caterpillar *Spodoptera frugiperda*. The inoculum isolated 6 was determined by the baculovirus polyhedron methodology of counting in a Neubauer chamber. Aliquots of 10 ml of baculovirus solution, were submitted 10, 25, 50, 60, 70 and 90 ° C. The polyhedra count was performed and concentrations compared to the control sample (25 ° C). For the analysis of virus viability, the volume of 30 ml inoculum baculovirus treated at temperatures (10, 25, 50, 60, 70, 90 ° C, was sprayed on the surface of maize leaves, and five days crawler 50 They were inoculated. After 48 hours of inoculation, 25 crawler each container were collected randomly and stored in plastic cups of 50 mL containing artificial diet and maintained to death by baculovirus. Temperature variations that SfMNPV inoculum was submitted, affected number of polyhedra when compared with the results obtained from the 25 ° C. Temperatures of 50, 60, 70 and 90 ° C showed no difference in the number of polyhedra. The temperature of 10 ° C was the most differed from the others, presenting decrease the number of viral particles agglomeration occurring polyhedra. The infected larvae mortality rates had no difference in the temperatures of 10, 25, and 50 ° C. The temperature 60 ° C there was a decrease in the mortality Crawler 52%, and 70 and 90 ° C showed Larval mortality rates of 15 and 7% respectively. The Baculoviruses *Spodoptera* withstands temperatures of 10, 25 and 50 ° C, without losing their effectiveness. The temperatures of 60, 70 and 90 ° C damages polyhedra progressively with increasing temperature levels.

Keywords: temperature, baculovirus, Resistance

1.INTRODUÇÃO

Um dos fatores limitantes para a aceitação das formulações a base dos agentes de controle biológico, é sua estabilidade sob condições de armazenamento, uma vez que, sua distribuição e comercialização depende da viabilidade e atividade do ingrediente ativo do produto. Esta estabilidade que está diretamente relacionada com as características do processo de produção, como: o meio de cultura utilizado, processo de secagem e o processo de formulação, além de fatores externos, tais como, temperatura e umidade (RUIZ, 2015).

A redução da eficácia do vírus durante a armazenagem, pode ser devido à hidrólise e auto-oxidação resultante da exposição ao oxigênio dos derivados de lípidos que estão presentes nos tecidos de insetos e não foram retirados pela filtração da suspensão viral (LASA; WILLIAMS; CABALLERO, 2009). Este fato também foi observado por Ruiz, 2015, que verificou que o superóxido e os radicais livres gerados pela auto-oxidação, foram capazes de modificar a estrutura dos ácidos nucleicos da nucleopolihedrovirus e causar perda de patogenicidade em armazenamento. Da mesma forma Lasa, Williams e Caballero, (2009), mostrou que a atividade inseticida das partículas virais armazenadas a 25 ° C foi reduzida após 6 meses de armazenamento, e completamnete inativada aos 18 meses do estudo. É importante ressaltar que uma boa formulação irá manter a estabilidade do produto durante um período médio ou longo do tempo (seis meses a dois anos), evitando a manutenção da cadeia de frio tanto no transporte, como na comercialização, diminuindo o custo dos produtos (QUIROGA et al., 2011).

O nível baixo de umidade no produto pode reduzir potenciais alterações químicas na formulação, evitando que interações com partículas virais seja, afetadas (RUIZ, 2015).

A temperatura afeta o ciclo de replicação dos baculovírus e o desenvolvimento do hospedeiro. O desenvolvimento das lagartas e a processo de infecção viral no inseto são complexos e devem ser sincronizados, pois ambos são sensíveis a temperatura (SPORLEDER *et al.*, 2008). O efeito da temperatura no desenvolvimento viral depende do hospedeiro e a espécie de baculovírus. O aparecimento dos primeiros sintomas de infecção até a ocorrência da morte larval, varia com a temperatura de criação do hospedeiro e, quanto menor a temperatura da criação do hospedeiro, maior o tempo até a morte por infecção viral. Altas temperaturas do hospedeiro podem inibir a expressão do vírus e a alternância de temperaturas afeta a expressão do patógeno. No entanto, a oscilação da temperatura aumentou a viabilidade do baculovírus em cultura de células (SHAO-HUA; HONG-LIANG; ZUO-HU, 1998) e

efeitos da temperatura sobre a produção de nucleopoliedrovírus são variáveis (SUBRAMANIAN et al., 2006).

2 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da temperatura sobre o SfMNPV e sua efetividade contra *Spodoptera frugiperda*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos do SfMNPV quando submetido a diferentes temperaturas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos do Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas (ICTE) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), na cidade de Uberaba, no Estado de Minas Gerais - Brasil.

3.1 CRIAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*

As pupas de *S. frugiperda* foram cedidas pelo Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPMS/Embrapa), no município de Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais, Brasil.

As mariposas de *S. frugiperda* emergidas foram colocadas em gaiolas de PVC de 60 cm de altura e 250 mm de diâmetro, contendo papéis chamex para a oviposição e alimentados com solução de sacarose 10% e ácido ascórbico 0,1% dispostas em copos descartáveis de 50 mL. Os ovos foram recolhidos e colocados em sacos plásticos transparentes até a eclosão das lagartas. As lagartas recém eclodidas foram transferidas para dieta artificial, elaborada segundo Valicente e Barreto (2003) e mantidas a 25°C. Aos sete dias, as lagartas foram individualizadas em recipientes descartáveis de 50 mL com dieta, de modo a dar continuidade ao ciclo normal da espécie e gerar adultos (mariposas).

3.2 MULTIPLICAÇÃO DE SfMNPV

Para a produção de SfMNPV, folhas de milho foram submergidas em solução de hipoclorito na concentração de 100 mL (ClO⁻)/5000mL e deixadas em repouso por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens com água purificada para a retirada do hipoclorito da superfície das folhas.

O inóculo inicial do isolado 6 de vírus foi cedido pelo Dr. Fernando Hercos Valicente (Embrapa), Sete Lagoas - MG, pois esse isolado causa alta mortalidade da lagarta-do-cartucho e alta produção viral por lagarta. A suspensão de baculovírus na concentração de 2×10^6 poliedros/mL foi preparada e pulverizada com um pulverizador manual na superfície das folhas e o tratamento testemunha pulverizado apenas com água destilada. O surfactante não-iônico Tween 20[®] (Merck Schuchardt, Germany) (Polioxietileno-sorbitol, como dispersante) foi adicionado em todas as suspensões, garantindo maior dispersão dos poliedros na superfície

das folhas. Posteriormente, lagartas de sete dias foram colocadas em vasilhas plásticas de 42 x 27cm sobre folhas de milho contendo *Baculovirus spodoptera*, mantidas em inoculação por 48 horas, para tentar minimizar os efeitos do canibalismo, que é um fator limitante num sistema de produção de baculovírus e foi significativo com lagartas de sete dias de idade, inoculadas com SfMNPV em folhas de milho, após um período de inoculação de 72 horas (VALICENTE *et al.*, 2013). As lagartas foram individualizadas em recipientes descartáveis de 50mL com dieta artificial, como a descrita por Valicente e Barreto (2003), e mantidas até ocorrência de sua morte entre 5 a 10 dias da inoculação. O material viral coletado foi armazenado em freezer a -18°C para inibir crescimento de microrganismos.

3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As cinco amostras trabalhadas foram recolhidas de forma aleatória da produção piloto da empresa Vitae Rural Biotecnologia no período de três meses.

Para cada amostra, foram pesados 2 g de lagartas infectadas por baculovírus. Com auxílio de um cadinho e pistilo as lagartas foram maceradas e coadas em tecido "voil" com 10 mL de água purificada. O inóculo gerado foi colocado em tubo Falcon de 15 mL e a concentração de vírus determinada por meio da metodologia de contagem de poliedros.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE POLIEDROS

Para quantificação do número de poliedros de cada amostra, realizou-se uma diluição seriada, sendo:

1º tubo - Pipetado 1 mL de cada amostra do inóculo puro em 9 mL de água purificada.

2º tubo - Do tubo 1 foi recolhido 1mL de inóculo e transferido para 9mL de água purificada no tubo 2;

3º tubo - Do tubo 2 foi recolhido 1mL de inóculo e transferido para 9mL de água purificada no tubo 3;

Em todas as etapas, os tubos foram agitados para homogeneização. O inóculo diluído foi colocado na Câmara de Neubauer, sendo a contagem de poliedros realizada para cada amostra.

3.5 TESTE DE TEMPERATURA COM SfMNPV

Amostras de SfMNPV foram preparadas previamente e submetidas a seis níveis de temperatura.

3.5.1 Teste com diferentes temperaturas

Cinco amostras contendo baculovírus e água purificada na concentração de aproximadamente 2×10^6 pol/mL foram preparadas.

Utilizando tubos Falcon, foram adicionadas alíquotas de 10 mL da solução de baculovírus. Os tubos foram aquecidos por 15 e 30 minutos em banho-maria nas temperaturas (50, 60, 70 e 90°C). Outro tubo deixado em temperatura ambiente (25°C) por 15 e 30 minutos e o último resfriado a 10°C por 15 e 30 minutos. Após o período de exposição a suas respectivas temperaturas, a contagem dos poliedros das amostras foi realizada em câmara de Neubauer e comparadas com a amostra controle em temperatura ambiente. Foram realizadas quatro repetições de cada amostra e os resultados calculados estatisticamente.

3.5.2 Análise da viabilidade do SfMNPV após tratamento com diferentes temperaturas

As folhas de milho foram coletadas e submergidas em água purificada com hipoclorito na concentração de 100 mL (ClO^-)/5000mL (água purificada) por 20 minutos. Após este procedimento, realizou-se o enxague das folhas por quatro vezes em água purificada. Para a seleção de lagartas, 50 lagartas com idade de cinco dias foram utilizadas para cada tratamento com as temperaturas e o controle. Na inoculação das lagartas, o volume de 30 mL do inóculo de baculovírus tratado nas temperaturas (10, 25, 50, 60, 70 e 90°C), foi pulverizado na superfície das folhas de milho, e após uma breve secagem, 50 lagartas de cinco dias foram inoculadas. As folhas foram colocadas inteiras nas vasilhas para teste e antes que secagem totalmente, evitando que prejudique a ingestão das folhas pelas lagartas. Após 48 horas de inoculação, 25 lagartas de cada vasilha foram coletadas aleatoriamente e armazenadas em copos descartáveis de 50 mL contendo dieta artificial e mantidas até morrerem pelo baculovírus. Para o controle do teste, foi pulverizado nas folhas de milho somente o inóculo feito em água purificada e após a secagem foi aplicada a metodologia descrita anteriormente. Realizou-se quatro repetições para cada amostra.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Statistica 10.0. Os dados obtidos nos testes com os pHs e temperaturas serão submetidos ao teste de análise de variância seguida do teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância demonstrou que não existe interação (F: 0,28 P: 0,596) entre o tempo de exposição de 15 e 30 minutos nos diferentes níveis de temperatura ($P > 0,05$) (Tabela 3). Com isto, as variações de tempo testadas foram retiradas e uma nova análise de ANOVA one-way executada.

Tabela 3 - Análise de variância para o efeito da temperatura sobre o SfmNPV.

Fonte de Variação	Contagem de Poliedros	
	F	P
Temperaturas (T1)	11,07	0,001*
Tempo 15 x 30 (T2)	0,28	0,596
(T1) x (T2)	1,12	0,352

* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

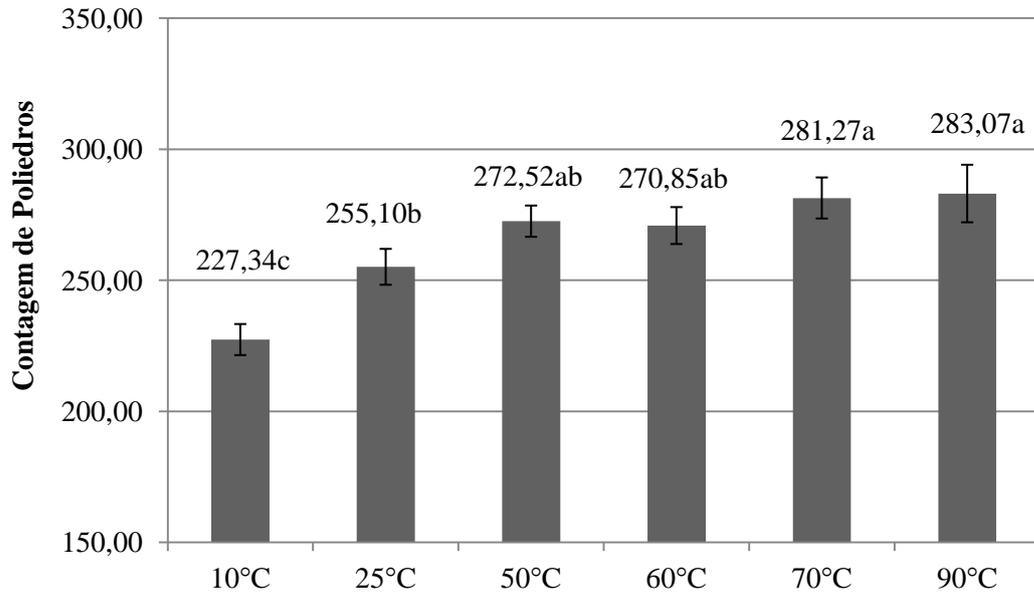
Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

As variações de temperatura as quais o inóculo de SfmNPV foi submetido, afetaram o número de poliedros, quando comparados com os resultados obtidos a partir da temperatura de 25°C, considerada a temperatura ideal.

As temperaturas de 50, 60, 70 e 90°C não apresentaram diferença quanto ao número de poliedros, o que indica que as partículas virais não perderam sua forma circular com o aumento progressivo das temperaturas, sendo visualizadas em camara de Neubauer (Figura 9).

A temperatura de 10°C foi a que mais diferiu das demais temperaturas testadas, apresentando queda do número de partículas virais (Figura 9). De acordo com a Figura 10, no tratamento com inóculo a 10°C ocorreu aglomeração de poliedros, o que provavelmente foi o causador da queda na contagem viral.

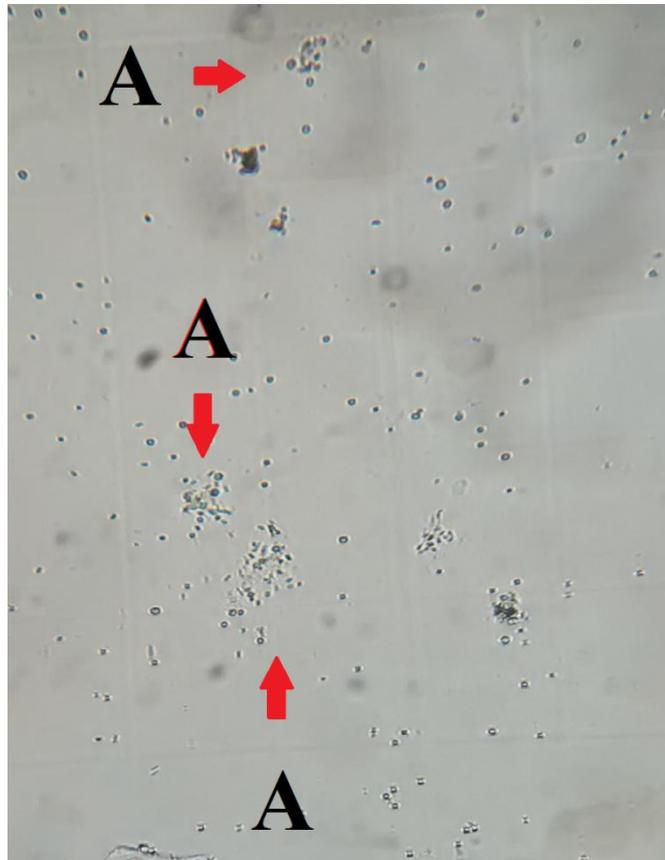
Figura 9 - Contagem de Poliedros do inóculo a partir da exposição de diferentes temperaturas.



Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Figura 10 - Aglomerações de poliedros quando submetidos a temperatura de 10°C por 30 minutos.



Fonte: Do Autor, 2015.

Os índices de mortalidade de lagartas infectadas não tiveram diferença quando o inóculo de baculovírus foi submetido as temperaturas de 10, 25, e 50°C, o que indica que estas temperaturas não afetam a atividade inseticida do SfMNPV durante o tempo de exposição de 30 minutos (Tabela 4). Os dados apresentados condizem com as análises apresentadas por Camacho, Gomez e Villamizar (2013), onde as temperaturas de 30, 40 e 50°C, não apresentaram diferenças estatísticas, quanto a infecção de lagartas *S. frugiperda*, obtendo níveis de infecção de 97%, por até 3 horas de exposição.

Tabela 4 - Mortalidade (%) média e EPM de *S. frugiperda* (infectadas e contaminadas) após exposição do inóculo de SfMNPV, a diferentes níveis de temperatura.

Tratamentos	Lagartas Infectadas ± EPM	Lagartas Contaminadas ± EPM
10°C	93 ± 3,00a	1 ± 1,00a
25°C	89 ± 1,00a	8 ± 1,63b
50°C	89 ± 1,91a	3 ± 1,91ab
60°C	52 ± 9,80b	0 ± 0,00a
70°C	15 ± 1,91c	1 ± 1,00a
90°C	7 ± 4,43c	0 ± 0,00a

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Na temperatura de 60°C houve uma queda na mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* (52%) quando comparada aos dados obtidos na temperatura de 25°C (89%), após 30 minutos de exposição (Tabela 4). Camacho, Gomez e Villamizar (2013), relataram redução da atividade inseticida de 48,82% nos tempos de exposição de 30, 40 e 60 minutos a 60°C e 51,37% nos tempos de 120 e 180 minutos.

O SfMNPV se mostrou muito sensível as temperaturas de 70 e 90°C, apresentando índices de mortalidade de lagartas de 15 e 7%, respectivamente (Tabela 4). Os resultados apresentados se assemelham com que relata a literatura, onde a maioria dos baculovírus de multiplicam adequadamente entre 25°C e 29°C e não toleram temperaturas elevadas.

De acordo com a Tabela 4 os resultados de mortalidade de lagartas contaminadas, ou seja, lagartas que não morreram pela infecção do baculovírus, demonstraram que o nível de contaminação foi maior na temperatura de 25°C (8%). O índice baixo de contaminação das lagartas a 10°C é explicado pela falta de crescimento de microrganismos presente no extrato bruto de baculovírus durante o período de exposição que foi de 15 e 30 minutos. As temperaturas de 50, 60, 70 e 90°C, também apresentaram números baixos de lagartas contaminadas, isto se deve ao fato de que os microrganismos são destruídos quando expostos a temperaturas mais elevadas (CAMACHO; GOMEZ; VILLAMIZAR, 2013).

5 CONCLUSÃO

O SfMNPV resiste a temperatura de 10, 25 e 50°C, sem perder sua eficiência. As temperaturas de 60, 70 e 90°C danificam os poliedros de maneira progressiva em relação aos níveis de temperatura.

REFERÊNCIAS

CAMACHO, J. E.; GÓMEZ, M. I.; VILLAMIZAR, L. F. Efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 12, n. 3, p. 437-450, jul.2013.

LASA, R.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. The attractiveness of phagostimulant formulations of a nucleopolyhedrovirus-based insecticide depends on prior insect diet. **Jornal Pesticide Science**, v. 89, p. 247-250, feb. 2009.

RUIZ, L. M. Q. **Uso de baculovirus como alternativa de control biológico de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maíz: una revisión conceptual y de avances en su aplicación.** Universidad Abierta y a Distancia. Tese de Mestrado, 2015.

SHAO-HUA, C.; HONG-LIANG, S.; ZUO-HU, A. L. Effect of Temperature Oscillation on Insect Cell Growth and Baculovirus Replication. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2237-2239, jun. 1998.

SPORLEDER, M. *et al.* Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). **Biological Control**, v. 44, p. 286-295, jan. 2008.

SUBRAMANIAN, S. *et al.* Influence of incubation temperatura on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 37, p. 367-374, mar. 2006.

VALICENTE, F.H., BARRETO, M.R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 32, n. 4, p. 639-644, out - dez, 2003.

VALICENTE, F.H., *et al.* Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, janeiro 2013.

CAPÍTULO 4
CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas realizadas com o *Baculovirus spodoptera*, apresentaram-se satisfatórias para análise do efeito do vírus mediante alterações em níveis de pH e temperatura.

Os dados provenientes dos ácidos testados, demonstraram grande eficiência na redução de microrganismos nas soluções, sendo possível estabelecer uma metodologia de tratamento do material viral particulado, que reduz estes agentes sem causar prejuízos a formulação do biopesticida.

Os pH inferiores a 4, resultantes das soluções ácidas utilizadas nos experimentos, causaram alterações de contato entre os poliedros virais (aglomerados), sem inviabilizá-los, como foi comprovado nos testes em vivo utilizando lagartas *S. frugiperda*. Com isso, é possível impedir o crescimento bacteriano no formulado de baculovírus, até que o mesmo seja seco, já que atualmente o pH do inóculo é de aproximadamente 7, índice considerado ótimo para o aumento de contaminantes.

Com estabelecimento da temperatura de resistência do vírus de aproximadamente 50°C, torna-se possível a criação de um protocolo de secagem do formulado de baculovírus de maneira satisfatória, sem ultrapassar a temperatura limite que o vírus suportaria, impedindo a degradação deste material que reduziria sua atividade à campo.