

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Tainá Marques Sampaio

**Caracterização e manejo de infecção microbiana em *Spodoptera  
frugiperda***

Uberaba/MG

2022

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Caracterização e manejo de infecção microbiana em *Spodoptera  
frugiperda***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental

Orientadora: Dra. Mônica Hitomi Okura

Uberaba/MG

2022

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

S186c Sampaio, Tainá Marques  
Caracterização e manejo de infecção microbiana em *Spodoptera  
frugiperda* / Tainá Marques Sampaio. -- 2022.  
51 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022  
Orientadora: Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura

1. *Spodoptera frugiperda*. 2. Insetos - Criação. 3. Microsporídios. 4.  
Milho - Doenças e pragas. I. Okura, Mônica Hitomi. II. Universidade Fede-  
ral do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 593.195:632

**TAINÁ MARQUES SAMPAIO**

**CARACTERIZAÇÃO E MANEJO DE INFECÇÃO MICROBIANA EM**  
*Spodoptera frugiperda*

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, para obtenção do título de mestre.

**Uberaba, 23 de setembro de 2022.**

**Banca Examinadora:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mônica Hitomi Okura**

**Orientadora - UFTM**

**Prof. Dr. Edson Hirose**

**Membro Titular - Embrapa Soja**

**Prof. Dr. Robson Thomaz Thuler**

**Membro Titular - IFTM**



Documento assinado eletronicamente por **MONICA HITOMI OKURA, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 12:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art.

eletrônica

34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edson Hirose, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson Thomaz Thuler, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13](#)

[de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0832810** e o código CRC **9E7DEE43**.



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Uberaba - MG

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação:	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL - PPGCTA				
Evento:	DEFESA DE DISSERTAÇÃO				
Data:	23 DE SETEMBRO DE 2022	Início em:	09h00	Término em:	12h34
Número de matrícula aluno:	2020.2075.6				
Nome do aluno:	TAINÁ MARQUES SAMPAIO				
Título do trabalho:	Caracterização e manejo de infecção microbiana em <i>Spodoptera frugiperda</i>				
Área de concentração:	Qualidade Ambiental				
Linha de Pesquisa:	Tecnologias de prevenção e controle de impactos ambientais				
Projeto de pesquisa vinculado:	Aprimoramento e produção de biopesticida à base de Baculovirus spodoptera				

Reuniu-se de forma remota, utilizando-se a plataforma Google Meet (<https://meet.google.com/ong-dcva-csb>), em conformidade com o disposto na Resolução COPPG/UFTM nº 38, de 21 de março de 2022, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL, assim composta pelos Professores Doutores: MONICA HITOMI OKURA (UFTM), EDSON HIROSE (EMBRAPA SOJA) E ROBSON THOMAZ THULER (IFTM). Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Mônica Hitomi Okura (orientadora) apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Concluída a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca se reuniu e atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

APROVADA

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFTM.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada, dela sendo lavrada a presente ata, que foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por MONICA HITOMI OKURA, Professor do Magistério Superior, em 07/10/2022, às 07:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Edson Hirose, Usuário Externo, em 13/10/2022, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Robson Thomaz Thuler, Usuário Externo, em 13/10/2022, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0832808 e o código CRC B50C16B4.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus e aos espíritos de luz que me guiam, me iluminam e abençoam diariamente.

Aos meus pais, Silvânia e Osmar, e irmãs, Nayara, Maíla e Taiza, por todo apoio, confiança e amor. Por, apesar da distância, se fazerem presentes em todas as etapas da minha vida. Por me lembrarem todos os dias o motivo de estarem nesse plano, por todos os ensinamentos primordiais para minha existência.

Ao Leone, meu amigo, companheiro e amor, por todo apoio, suporte e dedicação durante todos os momentos. Por me continuar me incentivando durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

A professora Mônica, que foi mais que uma orientadora, pela paciência e confiança durante toda a pesquisa, me ensinando mais do que apenas o necessário para o meio acadêmico, mas sim para a vida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental que, direta ou indiretamente, foram responsáveis pela minha formação e aprendizado nessa etapa tão importante.

A Jenniffer e ao Marcos, que muito mais que colegas de Pós-graduação, foram amigos de todas as horas, fundamentais para enfrentar os problemas e os momentos de desespero.

A CAPES pelo incentivo financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

A todos que, de uma maneira ou outra, estiveram presentes e foram importantes durante a execução da pesquisa.

## RESUMO

*Spodoptera frugiperda*, conhecida popularmente como lagarta do cartucho do milho, é um inseto praga presente que possui a capacidade de reduzir em até 70% da produtividade de plantas de milho. Conhecer os parâmetros biológicos de um inseto é fundamental para o desenvolvimento de estratégias e metodologias para seu manejo eficiente. A criação de insetos em condições laboratoriais e em meios artificiais possibilita a realização de estudos entomológicos que geram expressivos avanços de técnicas e estratégias a serem implementadas no manejo de pragas nos sistemas agrícola. Um problema frequente nessas criações é a ocorrência de patógenos ou contaminantes microbianos, dentre os microrganismos mais observados estão fungos e bactérias. Desta maneira, o presente trabalho tem como objetivo determinar os microrganismos causadores da infecção observada em uma população comercial de *Spodoptera frugiperda* e avaliar a eficiência de alguns fármacos no controle da referida infecção. Para isso foi necessário identificar os indivíduos infectados, isolar e identificar os microrganismos presentes no corpo no inseto e então induzir a infecção seguindo os postulados de Koch. Fármacos antimicrobianos foram utilizados com o intuito de diminuir ou controlar a infecção causada pelos microrganismos encontrados. Foram isolados quatro diferentes microrganismos, sendo eles duas leveduras (*Candida* sp e *Brettanomyces* sp), uma bactéria (*Streptococcus* sp) e um microsporídeo. Foi possível reproduzir os sintomas que foram observados na criação industrial, assim como identificar o microrganismo responsável por 55,71% da mortalidade das lagartas a partir do quinto dia em contato com o patógeno, chegando a  $8 \times 10^3$  esporos/mm<sup>3</sup>. Os fármacos utilizados não demonstraram diferença significativa no controle da infecção. Foi possível concluir, ao identificar e estudar os microrganismos causadores da mortalidade na criação comercial de *S. frugiperda*, que as leveduras e bactéria não foram as responsáveis pela doença presente na criação original. A confirmação partir dos Postulados de Koch, demonstrou que o microsporídeo foi o microrganismo com maior potencial patogênico e que deve ser melhor estudado em trabalhos futuros.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Criação massal; Microsporídeo.



## ABSTRACT

*Spodoptera frugiperda*, popularly known as the corn cartridge caterpillar, is a present pest insect that has the ability to reduce corn plant productivity by up to 70%. Knowing the biological parameters of an insect is essential for the development of strategies and methodologies for its efficient management. The creation of insects under laboratory conditions and in artificial means makes it possible to carry out entomological studies that generate significant advances in techniques and strategies to be implemented in pest management in agricultural systems. A frequent problem in these creations is the occurrence of pathogens or microbial contaminants, among the most observed microorganisms are fungi and bacteria. Thus, the present work aims to determine the microorganisms that cause the infection observed in a commercial population of *Spodoptera frugiperda* and to evaluate the efficiency of some drugs in the control of this infection. For this, it was necessary to identify the infected individuals, isolate and identify the microorganisms present in the insect's body and then induce the infection following Koch's postulates. Antimicrobial drugs were used in order to reduce or control the infection caused by the microorganisms found. Four different microorganisms were isolated, being two yeasts (*Candida* sp. and *Brettanomyces* sp.), one bacterium (*Streptococcus* sp.) and one microsporidium. It was possible to reproduce the symptoms that were observed in industrial breeding, as well as to identify the microorganism responsible for 55.71% of caterpillar mortality from the fifth day in contact with the pathogen, reaching  $8 \times 10^3$  spores/mm<sup>3</sup>. The antimicrobial used showed no significant difference in infection control. It was possible to conclude, by identifying and studying the microorganisms that cause mortality in the commercial breeding of *S. frugiperda*, that yeasts and bacteria were not responsible for the disease present in the original breeding. Confirmation based on Koch's Postulates demonstrated that microsporidia was the microorganism with the greatest pathogenic potential and that it should be better studied in future works.

Keywords: Fall armyworm; Mass creation; Microsporidium.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferença dos sintomas apresentados por lagartas da espécie <i>Spodoptera frugiperda</i> doentes.....	29
<b>Figura 2.</b> Gráfico representativo da relação entre a porcentagem de lagartas infectadas e os dias de observação do experimento.....	31
<b>Figura 3.</b> Evolução sintomática de lagartas pretas provenientes do tratamento 2 (microsporídeo).....	32
<b>Figura 4.</b> Evolução sintomática de lagartas brancas provenientes do tratamento 2 (microsporídeo) .....	32
<b>Figura 5.</b> Mariposas provenientes do tratamento 2 (microsporídeo) com deformidades na asa.....	33
<b>Figura 6.</b> Pontos de necrose comumente encontrados em lagartas doentes.....	34
<b>Figura 7.</b> Mariposas provenientes dos tratamentos com leveduras que apresentaram deformações nas asas.....	34
<b>Figura 8.</b> Mariposa proveniente do tratamento 5 (bactéria) que apresentou deformações nas asas.....	35
<b>Figura 9.</b> Exemplar de mariposa saudável, sem deformações, proveniente do tratamento 1 (testemunha).....	35
<b>Figura 10.</b> Relação entre a quantidade de sobrevivência e morte de <i>Spodoptera frugiperda</i> exposta a diferentes microrganismos.....	36
<b>Figura 11.</b> Resultado da porcentagem de contaminação em cada tratamento com fármacos antifúngicos.....	39
<b>Figura 12.</b> Diferença das médias de contaminação de lagartas dos tratamentos com Fluconazol, Itraconazol, Terbinafina e grupo Testemunha.....	36
<b>Figura 13.</b> Resultado da porcentagem de infecção em cada tratamento com fármacos antibacterianos.....	41
<b>Figura 14.</b> Diferença das médias de contaminação de lagartas dos tratamentos com Tetraciclina, Metronidazol 1, Metronidazol 2, Metronidazol 3 e grupo Testemunha.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de antimicrobianos com base em diferentes variáveis.....	23
<b>Tabela 2.</b> Demonstração de todos os tratamentos a partir do número amostral de cada um, sendo analisado a presença de sintomas, porcentagem de mariposas e quantidade de mariposas com deformação nas asas.....	36
<b>Tabela 3.</b> Contagem de esporos em lagartas contaminadas com microsporídio, representando valor de F e p.....	37
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de formação de pupa, emergência de mariposa e de contaminação em tratamentos utilizando fármacos antifúngicos para controle de contaminação em <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	38
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de formação de pupa, emergência de mariposa e de contaminação em tratamentos utilizando Tetraciclina para controle de contaminação em <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	41

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 GERAL .....	16
2.2 ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
3.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	17
3.2 CRIAÇÃO LABORATORIAL DE INSETOS.....	18
3.2 CRIAÇÃO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	20
3.3 CRIAÇÃO MASSAL DE <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	21
3.4 MICRORGANISMOS .....	21
3.5 FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS .....	22
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LAGARTAS CONTAMINADAS .....	25
4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS .....	25
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	26
4.4 POSTULADO DE KOCH .....	26
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS.....	27
4.6 TRATAMENTO DA CONTAMINAÇÃO UTILIZANDO FÁRMACOS.....	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1 SINTOMAS .....	29
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	29
<b>5.2.1. Bactéria</b> .....	29
<b>5.2.2. Leveduras</b> .....	29
<b>5.2.3 Microsporídio</b> .....	30
5.3 INDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO – POSTULADO DE KOCH.....	30
<b>5.3.1 Microsporídio</b> .....	30
<b>5.3.2 Leveduras</b> .....	34
<b>5.3.3 Bactéria</b> .....	35
<b>5.3.4 Testemunha</b> .....	35
5.3 CONTAGEM DE ESPOROS .....	37
5.4 TRATAMENTO COM FÁRMACOS .....	38
<b>5.4.1 Antifúngicos</b> .....	38
<b>5.4.2 Antibacterianos</b> .....	40
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	43

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A – Teste Qui-Quadrado .....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE B – Teste de Tukey Antifúngicos .....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE C – Teste de Tukey Antibacterianos .....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Espécies invasoras vêm se tornando uma preocupação global, uma vez que ameaçam a integridade de ecossistemas agrícolas e florestais, afetam a biodiversidade e causam perdas econômicas significativas. Conhecida como lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é nativa de regiões tropicais e subtropicais das Américas e se alimenta principalmente de milho, algodão, sorgo e arroz (HRUSKA, 2019).

*S. frugiperda* é uma praga polífaga que possui relevância global, especialmente pelos danos que causa em plantas de milho, podendo reduzir a produtividade em até 70% quando ataca plantas jovens (HRUSKA, 2019). Além disso, também danifica significativamente culturas de algodão, soja, arroz e sorgo, tornando-se importante o estudo de metodologias de controle para essa praga que afeta economicamente o agronegócio no mundo todo (DAY et al., 2017).

A criação laboratorial de insetos se faz importante devido a necessidade de conhecer os aspectos biológicos de pragas como a *S. frugiperda* com o intuito de desenvolver novas metodologias de controle e prevenção deste inseto. Em criações massais é possível realizar estudos a respeito das condições ideais de crescimento, sobrevivência e reprodução, além de ser possível estabelecer a relação de toxicidade que microrganismos apresentam quando em contato com o inseto (BOTTEON, 2018; BOTELHO et al., 2019).

Há uma vasta gama de inimigos naturais pelos quais *S. frugiperda* é atraída e estudos demonstram o alto nível de mortalidade que eles causam no inseto. Os principais inimigos naturais da lagarta-do-cartucho são bactérias, fungos e vírus (PRASANA et al., 2018; SHILESHA et al., 2018; HRUSKA, 2019; WAN et al., 2021).

Os fungos são importantes inimigos naturais da lagarta do cartucho. São comumente encontrados em insetos e amostras de solo, demonstrando patogenicidade para diversas ordens de insetos, como *Lepidoptera*, *Coleoptera* e *Hemiptera*. Agem a partir do contato sobre seu hospedeiro, sendo que os conídios ou esporos dos fungos atuam como unidades infectivas (ZAMBIAZZI et al., 2016; FRONZA et al., 2017).

O filo *Microsporidia*, pertencente ao Reino Fungi, apresenta organismos parasitas intracelulares obrigatórios, são capazes de infectar vertebrados e invertebrados, principalmente insetos. Embora haja um grande número de espécies de microsporídios descritas e associadas como patógenos de insetos, são poucos os estudos que desmitificam

a dinâmica existente entre esses microrganismos quando inseridos em populações de insetos e menor ainda aqueles que os relacionam à insetos tidos como pragas (GHOSH; WEISS, 2012; MORETTO et al., 2015; PAN et al., 2018).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Determinar os microrganismos causadores da infecção observada em uma população comercial de *Spodoptera frugiperda* e a eficiência de alguns fármacos no controle da referida infecção.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar os diferentes sintomas apresentados por lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas em uma criação;
- II. Isolar os microrganismos presentes nessas lagartas contaminadas;
- III. Observar e relatar os sintomas que os microrganismos causaram em lagartas e mariposas;
- IV. Avaliar o efeito de componentes profiláticos em lagartas *S. frugiperda* infectadas.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Spodoptera frugiperda*

Popularmente conhecida como lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) é considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil. Esse título se dá devido aos danos provocados às lavouras e a dificuldade de controle da sua população por métodos tradicionais de controle de pragas, além da sua alta frequência de ocorrência (VALICENTE, 2015; MONTEZANO et al., 2018).

*S. frugiperda* é um inseto com metamorfose completa, isto é, durante seu ciclo de vida passa por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adultos. Sob condições controladas, à temperatura ideal de 25°C, seu ciclo de vida dura aproximadamente 30 dias. A postura ocorre em massa e a eclosão dos ovos se dá em três dias. As lagartas recém emergidas alimentam-se das cascas dos ovos e, à medida que crescem, raspam as folhas mais novas da planta, provocando um sintoma conhecido como “folhas raspadas” característico desta espécie. Posteriormente, as lagartas se deslocam para a região do cartucho do milho e permanecem em seu interior por um período de 12 a 30 dias, causando danos graves à planta. Ao longo do estágio larval, de acordo com a temperatura e a dieta, as lagartas podem passar por até sete instares, atingindo 50 mm de comprimento ao final desta fase. Conforme encontra-se totalmente desenvolvida, a lagarta sai do cartucho e adentra no solo, dando início à transformação em pupa. Entre 10 e 12 dias, uma pupa com aproximadamente 15 mm de comprimento estará formada. A mariposa, mede em média 35 mm de envergadura, é caracterizada por possuir coloração parda-escura nas asas anteriores e branca-acinzentada nas posteriores, além de pontos claros na região central de cada asa. O adulto apresenta longevidade de aproximadamente 12 dias. (CRUZ, 1995).

Nativa de regiões tropicais e subtropicais das Américas e, com base na sua capacidade de dispersão, é considerada uma espécie endêmica em todo o Ocidente. A sua primeira ocorrência foi relatada na América do Norte em 1928, embora sua ocupação ocorra preferencialmente nos trópicos (NAGOSHI et al., 2017; MONTEZANO et al., 2018). Além do Brasil, *S. frugiperda* também é considerada uma das pragas de maior importância da cultura do milho no Chile, Colômbia, Peru, Guatemala, México e Venezuela. Além disso, essa espécie dominou também regiões de clima temperado, como os Estados Unidos, onde migram durante a primavera, outono e verão, podendo se deslocar do Norte do país até o Canadá. Há relatos de ocorrência deste inseto-praga no

Caribe (CRUZ, 1995), no Sul e Sudeste da Ásia (SUN et al., 2021) e em vários pontos do continente africano (NIASSY et al., 2021).

### 3.2 CRIAÇÃO LABORATORIAL DE INSETOS

Conhecer os parâmetros biológicos de um inseto é fundamental para o desenvolvimento de estratégias e metodologias para seu manejo eficiente. A criação de insetos em condições laboratoriais e em meios artificiais é essencial quando tem-se o intuito de obter um material biológico puro e de qualidade, possibilitando a realização de estudos entomológicos que geram expressivos avanços de técnicas e estratégias a serem implementadas no manejo de pragas nos sistemas agrícola (PARRA, 2001; COHEN, 2018).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de metodologias de criação de insetos possibilitou grande progresso para a área da Entomologia, principalmente no que se diz respeito a implantação de programas de criação massal para controle de pragas agrícolas. Desde o século 20, a criação de insetos em laboratório vem evoluindo e, a partir então, o desenvolvimento de pesquisas na área de nutrição de insetos permitiu que estes animais fossem criados em meios artificiais, tornando viável a multiplicação de populações tidas como importantes para o meio agrícola e para saúde humana. Assim, estudos básicos e aplicados passaram a ser realizados nas diferentes áreas da Entomologia, como, por exemplo, comportamento, fisiologia, biologia, toxicologia, patologia, entre outros (PARRA, 2000; BOTTEON, 2018).

Parra (1998) fez a distinção de três categorias referentes à criação de insetos, sendo elas: 1) criação de pequena escala; 2) criação comercial; 3) criação massal. Criações em pequena escala permitem que bioensaios gerais sejam realizados, como o estudo da taxonomia do inseto, por exemplo; enquanto em criações de maior escala, é possível realizar experimentos mais específicos como o estudo de transmissão de agentes fitopatogênicos, mecanismo de resistência a inseticidas, entre outros. Já a criação massal, possibilita que seja realizada a liberação inundativa de agentes entomopatogênicos, parasitoides e/ou predadores em programas de controle de pragas (PARRA et al., 2002; PARRA, 2009; BOTTEON, 2018).

Independentemente do tipo de criação, há diferentes fatores que são considerados primordiais para a manutenção dos insetos, como: a população inicial dos insetos, o tipo

de alimento fornecidos e seus aspectos nutricionais, temperatura, umidade, fotoperíodo, recipientes de criação, além do controle de qualidade e assepsia (COHEN, 2018).

Aplicação e desenvolvimento de metodologias apropriadas para criação massal é imprescindível para que os resultados da produção de insetos sejam satisfatórios, uma vez que metodologias inadequadas podem afetar a eficiência e qualidade da produção (SORENSEN et al., 2012). Porém, a definição e implementação dessas metodologias tem se mostrado um desafio, principalmente se tratando das condições nutricionais que cada espécie apresenta. Tendo em vista que a alimentação é a fonte principal para inseto possuir obter os nutrientes fundamentais para seu desenvolvimento, o uso de dietas artificiais ou até mesmo naturais que sejam adequadas a uma determinada espécie, se torna vital para seu desenvolvimento saudável e, conseqüentemente, obtenção de várias gerações daquela espécie produzida (BOTELHO et al., 2019).

A dieta artificial a ser fornecida para a população de insetos deve apresentar os nutrientes necessários ao inseto (proteínas, vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídios e esteróis), propriedades físicas adequadas e fagoestimulantes (físicos e químicos), além de ser balanceada nutricionalmente, a fim de que o inseto se desenvolva de forma saudável suprimindo suas exigências nutricionais (PARRA, 2002). A dieta artificial facilita a criação de insetos em laboratório, uma vez que, quando balanceada, supre as necessidades nutricionais, torna possível a produção em larga escala, permite o controle de agentes patogênicos e pode reduzir os custos finais da produção (PARRA, 2009; BOTTEON, 2018).

Uma dieta artificial considerada adequada é tida como aquela que proporciona alta viabilidade larval e que a fase larval do inseto apresente duração semelhante à da natureza; que origina adultos com alta capacidade reprodutiva; que se aplique a mais de uma espécie. Além de possuir, em sua composição, componentes de baixo custo e facilmente adquiridos no mercado, demonstrar viabilidade total superior a 75% e manter estável a qualidade do inseto ao longo das gerações (PARRA, 2009).

Alguns fatores podem trazer problemas às criações massais no que se diz respeito a qualidade do inseto, como condições inadequadas de higiene, contaminação dos utensílios, equipamentos ou do local em que são produzidas as dietas artificiais, favorecendo o desenvolvimento de fungos e bactérias, acarretando a perda da produção (GRENIER, 2012; MALDONADO; POLANÍA, 2010).

Um problema frequente encontrado em criações de insetos é a ocorrência de patógenos ou contaminantes microbianos que gera situações preocupantes de desenvolvimento prolongado, redução do tamanho de adultos, flutuações discrepantes na qualidade do inseto e alta mortalidade da produção. Os microrganismos mais comumente encontrados em criações que acarretam a infecção de insetos são os fungos, bactérias, vírus, protozoários e nematoides. As principais fontes de contaminantes microbianos são insetos coletados em campo para iniciar uma criação, adquirir inseto infectado proveniente de outra criação ou dos ingredientes presentes na dieta (BUENO, 2000; TRIVELLATO, 2010; EILENBERG et al., 2015).

### 3.2 CRIAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*

O estudo de fatores que influenciam no desenvolvimento, sobrevivência e reprodução de *Spodoptera frugiperda* podem ser realizados a partir da criação laboratorial de insetos. Fatores como temperatura, umidade relativa do ar, tipo de dieta para crescimento ideal são amplamente estudados e podem servir de base para o desenvolvimento de metodologias eficazes para o controle desta praga.

Machado et al. (2021) descreveram a influência da temperatura no desenvolvimento de *S. frugiperda* em criação laboratorial e como esse fator afeta na determinação dos instares do inseto. Desta maneira, a temperatura ideal para criação massal é de 25°C evidenciando a duração total de 15 dias de fase larval, sendo três dias no 1º instar; quatro dias no 2º; dois dias o 3º; e três dias para o 4º e 5º instar. A determinação da duração dos instares em relação a temperatura de desenvolvimento é de extrema importância para estudos laboratoriais de insetos.

Li-mei (2021) realizaram a comparação de cinco diferentes dietas expostas a *S. frugiperda* criadas em laboratório durante quatro gerações consecutivas a fim de avaliar a influência da alimentação do desenvolvimento larval do inseto. As dietas naturais utilizadas foram folhas de milho, de trigo, de sorgo e de arroz, além da dieta artificial de Greene et al. (1976). Sob condições controladas de temperatura a 25±1°C, umidade relativa do ar em 75±5% e fotoperíodo de 16:8h, a dieta artificial demonstrou resultados de desenvolvimento larval mais rápido comparado com as demais, porém as folhas de milho beneficiam tanto o desenvolvimento quanto a sobrevivência do inseto.

Li et al. (2022) evidenciam a diferença da microbiota intestinal de *S. frugiperda* em condições de campo e de laboratório durante os estágios de vida do inseto, demonstrando que os insetos criados em laboratório apresentaram menor diversidade microbiana comparados com os de campo. Tal fato pode ser explicado devido a esterilidade da dieta artificial utilizada em criações laboratoriais, enquanto folhas vegetais apresentam microrganismos, portanto os componentes nutricionais são diferentes e interferem na proliferação de microrganismos no intestino do inseto.

### 3.3 CRIAÇÃO MASSAL DE *Spodoptera frugiperda*

A criação massal de *S. frugiperda* se dá a partir da coleta em campo de indivíduos ou da obtenção de pupas ou ovos advindos de uma criação laboratorial já instalada. Para melhor desenvolvimento e bem-estar do inseto, o ambiente deve permanecer climatizado e ser esterilizado, a temperatura ideal é de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa  $70 \pm 10\%$  e fotofase que pode variar de 12:12h, 14:10h a 16:8h (BUSATO et al., 2004; LI-MEI, 2021; PARRA; COELHO, 2022).

Durante a fase larval, é recomendado a individualização das lagartas devido a ocorrência de canibalismo. As metodologias se diferem quanto ao recipiente a serem individualizadas, porém independente de qual seja, deve-se adicionar a dieta artificial ou natural antes da individualização, a qual ficará disponível para o inseto até a formação de pupa. As dietas artificiais mais comumente utilizadas e presentes na literatura para essa espécie são a de Greene et al. (1976) e de Valicente e Barreto (2003), podendo haver alterações dos ingredientes (NADIM, 1991; BUSATO et al., 2004; STINGUEL, 2016).

As mariposas podem ser transferidas para gaiolas PVC de 60 cm de altura e 250 mm de diâmetro, contendo papéis chamex para a oviposição e recipientes contendo alimento feito com solução de sacarose 10% e ácido ascórbico 0,1%. As folhas com os ovos são retiradas das gaiolas e mantidas em sacos plásticos até a emergência das lagartas (PARRA, 2001; SOUSA, 2015).

### 3.4 MICRORGANISMOS

Há diferentes tipos de microrganismos que influenciam no desenvolvimento, sobrevivência e reprodução de insetos, podendo ser de forma benéfica ou não. Os fungos

entomopatogênicos são conhecidos pela capacidade de causar doenças e até a morte de artrópodes, em especial de insetos. Há também aqueles que possuem relações positivas ou neutras com o hospedeiro e estão presentes na microbiota do inseto, são endossimbiontes (VALADARES-INGLIS et al., 2020).

Os fungos mais conhecidos como patogênicos a *S. frugiperda* são *Beuveria bassiana*, *Metarhizium rileyi* e *M. anisopliae*. Estudos demonstram que larvas de *S. frugiperda* pulverizadas com *B. bassiana* apresentaram até 95% de mortalidade (WRAIGHT et al., 2010; GARCÍA; BEAUTISTA, 2021), se tratando de *M. rileyi* a mortalidade chega a 100% (CHÁVEZ et al., 2004) e *M. anisopliae* de 72,5% (ROMERO-ARENAS et al., 2014). Já os fungos pertencentes da microbiota e que podem ser encontrados no intestino do inseto, são principalmente os gêneros *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Candida* e alguns outros (YUNING et al., 2022).

Os microsporídios são parasitas intracelulares obrigatórios conhecidos principalmente por serem utilizados como controle biológico de abelhas, porém também são amplamente empregues contra gafanhotos. Há relatos de infecção de *Nosema* sp em *Cotesia flavipes*, entretanto poucos são os estudos que demonstram a patogenicidade desses microrganismos em Lepidoptera (VALADARES-INGLIS et al., 2020).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um dos microrganismos mais estudados como patógeno de *S. frugiperda* devido a sua capacidade de, após a fase de crescimento exponencial, produzir esporos e proteínas que possuem atividade inseticida específica (OCHOA; ARRIVILLAGA, 2009). Outra bactéria patogênica é a *Saccharopolyspora spinosa*, uma Actinobactéria, produz um ingrediente ativo que atua diretamente no sistema nervoso do inseto, provocando o aumento da atividade metabólica, espasmos musculares involuntários, tremores, fadiga e morte (PAREDES-SÁNCHEZ, 2021).

De acordo com Li et al. (2022) bactérias dos filos Firmicutes e Proteobacteria são encontradas na microbiota de *Spodoptera frugiperda* durante todo o desenvolvimento larval, especialmente as famílias *Enterococcaceae* e *Enterobacteriaceae*. Assim como os gêneros *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (YUNING, 2022).

### 3.5 FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

É comum a utilização de fármacos inclusos na dieta artificial para criação de insetos, com o objetivo de evitar a contaminação do substrato por microrganismos, especialmente fungos e bactérias. Segundo Parra (2015) os anticontaminantes químicos mais utilizados no substrato são: formaldeído; metilparahidroxibenzoato (nipagin), butil e propilparahidroxibenzoato, hipoclorito de sódio, ácido propiônico, benzoato de sódio, ácido benzóico, sorbato de potássio, ácido sórbico, estreptomicina penicilina e aureomicina.

Em criações massais de insetos, havendo a presença de contaminação da dieta ou infecção do inseto por microrganismo, antimicrobianos podem ser utilizados como forma de controlar, diminuir ou avaliar a ação frente a infecção. Simões (2012), por exemplo, avaliou a ação de Itraconazol, Metronidazol, Albendazol, Nifedipino e Benzimidazol para redução da infecção por microsporídeo em *Diatraea Saccharalis*.

Os antimicrobianos são, por definição, substâncias capazes de inibir o crescimento ou matar organismos, de forma a tratar ou prevenir uma infecção, diminuindo ou eliminando os patógenos e preservando, sempre que possível, os microrganismos originais da microbiota do hospedeiro. Podem ser classificados segundo diferentes aspectos: quanto ao espectro de ação, quanto à estrutura química e quanto aos efeitos sobre que exerce sobre o microrganismo (Tabela 1) (MACHADO et al., 2019).

**Tabela 1.** Classificação de antimicrobianos com base em diferentes variáveis.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>
<b>Microrganismos Suscetíveis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Antibacterianos;</li> <li>○ Antifúngicos;</li> <li>○ Antivirais;</li> <li>○ Antiparasitários.</li> </ul>
<b>Origem do antimicrobiano</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Antibióticos: produzidos por microrganismos;</li> <li>○ Quimioterápicos: sintetizados em laboratório.</li> </ul>
<b>Efeito sobre os microrganismos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bactericida: matam as bactérias;</li> <li>○ Bacteriostático: inibem o crescimento das bactérias, sendo necessária a atuação do</li> </ul>

	sistema imunológico para eliminação do mesmo.
<b>Mecanismo de ação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alteração da parede celular;</li> <li>○ Alteração da membrana citoplasmática;</li> <li>○ Interferência na replicação cromossômica;</li> <li>○ Inibição da síntese proteica;</li> <li>○ Inibição metabólica.</li> </ul>
<b>Espectro de ação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Espectro para Gram-positivas;</li> <li>○ Espectro para Gram-negativas;</li> <li>○ Amplo espectro;</li> <li>○ Ativo sobre protozoários;</li> <li>○ Ativo sobre fungos;</li> <li>○ Ativo sobre espiroquetas;</li> <li>○ Ativo sobre riquetsias, micoplasma e clamídias;</li> <li>○ Ativo sobre micobactérias;</li> <li>○ Ativo sobre algas.</li> </ul>

Fonte: adaptado de Machado et al. (2019).

No que se diz respeito aos antibacterianos, podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos, enquanto o primeiro atua eliminando diretamente o microrganismo, o segundo inibe o crescimento e a multiplicação bacteriana, possibilitando que o sistema imunológico do hospedeiro atue eliminando o patógeno. Também podem ser classificados em relação ao local de atuação, seu sítio-alvo, sendo estes: 1) síntese proteica; 2) síntese da parede celular; 3) síntese de ácido nucleico; 4) função da membrana celular; e 5) vias metabólicas (GOERING et al., 2020).

As Tetraciclina são bacteriostáticas e atuam inibindo a síntese proteica das bactérias. Apresentam um amplo espectro de atuação, sendo eficazes no tratamento de infecção causadas por microrganismos tanto gram-positivos quanto gram-negativos (FORD, 2019). Já o Metronidazol é um bactericida que afeta a síntese de ácidos nucleicos e que também apresenta amplo espectro de ação contra bactérias anaeróbicas (cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos e gram-positivos) (GOERING et al., 2020).

Se tratando dos antifúngicos, eles podem ser classificados em relação ao sítio-alvo e na estrutura química, porém a maioria atua na síntese das membranas intracelulares. A



flucitosina e a griseofulvina, entretanto, interferem na síntese do DNA, enquanto a caspofungina inibe a formação da parede celular (FORD, 2019; GOERING et al., 2020).

Os antifúngicos a base de azol atuam inibindo a síntese da membrana celular e além de demonstrarem um alto potencial terapêutico para infecções fúngicas, também apresentam, em sua maioria, baixa toxicidade ao hospedeiro. Atualmente, os triazóis Fluconazol e Itraconazol são largamente utilizados por apresentarem grande espectro de ação e alta seletividade para os fungos patogênicos (MACHADO et al., 2019; GOERING et al, 2020).

Já a terbinafina, é um antifúngico amplamente utilizado contra fungos cutâneos. Em seres humanos, atua inibindo a enzima esqualeno epoxidase, o qual impede a formação do lanosterol (precursor do ergosterol), gerando o acúmulo de esqualeno, composto tóxico ao organismo e, desta maneira, causa a lise da célula fúngica (MACHADO et al., 2019).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LAGARTAS CONTAMINADAS**

Foram observadas lagartas da criação que apresentavam sintomas distintos, as quais foram caracterizadas em dois grupos:

1) Lagartas pretas – lagartas encontradas mortas com coloração preto vivo, normalmente possuíam epiderme que se rompia facilmente, evidenciando a parte interna liquefeita e com odor característico;

2) Lagartas brancas – lagartas que possuíam o corpo endurecido, exibindo coloração branco leitosa e transparência na epiderme.

### **4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS**

Para identificação dos micro-organismos presentes, três (3) lagartas brancas e três (3) pretas foram maceradas individualmente em 1ml de solução salina e levadas a

centrifugação (3000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado (adaptado de SIMÕES, 2012).

Para isolamento dos microrganismos, foram utilizados os meios de cultura: Potato Dextrose Ágar (PDA), Ágar Malte, Ágar Sabouraud e Brain Heart Infusion (BHI). Foram realizadas sementeiras por meio de esgotamento em estrias nos meios de cultura em triplicata. Em seguida, foram colocadas em estufa a 25°C para o crescimento e observadas diariamente por 3 dias (adaptado de PEREIRA, 2019).

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a identificação da bactéria foram realizadas a técnica de coloração de Gram, e teste de catalase (VERMELHO et al., 2019).

Para identificação das leveduras foram realizadas as técnicas de coloração simples, observação do macrocultivo, série bioquímica: uréia, sacarose, glicose, nitrato (VERMELHO et al. 2019).

A identificação do microsporídio foi realizada pela observação do macrocultivo, coloração simples e identificação de esporos em microscópio (adaptado de SIMÕES, 2012).

#### 4.4 POSTULADO DE KOCH

Após a identificação dos microrganismos, realizou-se o isolamento da cultura pura em meio de cultura para realizar o Postulado de Koch. Com o auxílio de uma alça de inoculação, coletou-se uma a duas colônias do microrganismo que foi depositada em um tubo contendo 1mL de solução salina que foi homogeneizada.

A partir deste inóculo, testes de indução de contaminação pela técnica do Postulado de Koch foram executados. Foram utilizados copos de plástico de 50mL para disposição de, aproximadamente, 4mL de dieta artificial e, em seguida, 0,1mL da solução do inóculo foi adicionada sobre a dieta. Assim que a solução foi absorvida, 70 lagartas no 2º instar foram individualizadas nos copos e mantidas a  $25 \pm 2$  °C. A partir deste momento, as lagartas foram observadas e fotografadas diariamente, com o intuito de analisar o desenvolvimento das mesmas.

Os parâmetros avaliados foram: tempo de evolução dos sintomas, características dos sintomas, quantidade de lagartas contaminadas e mortas, número de pupas formadas, número de mariposas final e presença ou ausência de defeitos nos adultos.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS

Os esporos foram isolados a partir de lagartas *S. frugiperda* doentes provenientes do tratamento com microsporídio. Cinco lagartas brancas e cinco pretas foram maceradas individualmente em 1mL de solução salina estéril. As soluções foram filtradas através de camadas de gaze e submetidas a centrifugação de 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi pipetado em uma solução salina de 1mL, que por fim foi utilizado para quantificação dos esporos presentes em câmara de Neubauer (adaptado de SIMÕES, 2012). A contagem foi realizada em triplicata em cada amostra.

#### 4.6 TRATAMENTO DA CONTAMINAÇÃO UTILIZANDO FÁRMACOS

Fármacos que atuam no combate de diferentes tipos de microrganismos foram utilizados para analisar a eficácia no controle da contaminação presente nas lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Foram testados os antifúngicos Itraconazol, Terbinafina e Fluconazol; e antibacterianos Tetraciclina e Metronidazol. O experimento foi separado em três fases de aplicação tendo em vista, a quantidade amostral de lagartas.

##### A) Fase 1

Primeiramente, foram realizados testes com Itraconazol, Terbinafina e Fluconazol. Para inclusão dos fármacos na dieta, estabeleceu-se a quantidade de 100mg do medicamento para cada 1L de dieta artificial. O fármaco foi macerado para facilitar a absorção e homogeneização na dieta, o qual foi acrescentado ao final da produção da mesma. Em seguida, a dieta foi disposta sobre bandejas específicas utilizadas para criação das lagartas e então, as lagartas foram expostas ao alimento com medicamento (adaptado de SIMÕES, 2012).

A partir desse momento, observações diárias foram realizadas para avaliar o efeito dos fármacos sobre os insetos. A primeira fase teve fim no momento em que emergiram

as mariposas, podendo ser quantificados a porcentagem de pupas, mariposas e de morte de lagartas no decorrer do experimento, em cada tratamento.

B) Fase 2

Na segunda fase do experimento, os fármacos utilizados foram: Metronidazol e Tetraciclina. Neste caso, estabeleceu-se a quantidade de 400mg de medicamento para cada 1L de dieta, sendo que o método de inclusão na dieta artificial foi o mesmo citado anteriormente assim como a individualização das lagartas e observações realizadas (adaptado de SIMÕES, 2012).

C) Fase 3

A partir das primeiras análises realizadas com os medicamentos da segunda fase, foi possível estabelecer novas dosagens a fim de avaliar a eficácia no controle da contaminação através destes fármacos. Entre os medicamentos utilizados na segunda fase, houveram alterações na dosagem de Metronidazol para a realização de novos testes. Nesta fase, foram utilizados 2g e 5g ao invés de 400mg, portanto novos tratamentos foram estabelecidos. A inclusão dessa nova dosagem na dieta seguiu o mesmo protocolo citado anteriormente, assim como as observações diárias (adaptado de SIMÕES, 2012).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SINTOMAS

As lagartas *Spodoptera frugiperda* advindas de criação massal apresentavam diferentes sintomas físicos quando comparadas às saudáveis, sendo possível classificá-las em dois grupos a partir da sintomática: brancas e pretas.

As lagartas pretas (Figura 1a) evidenciavam coloração preto vivo em toda a epiderme a qual se rompia facilmente, enquanto as brancas (Figura 1b) demonstravam a epiderme transparente, sendo possível observar no interior do corpo estruturas de coloração branca, além de rigidez em todo o corpo.



**Figura 1.** Diferença dos sintomas apresentados por lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* doentes, em a) lagartas pretas; e b) lagartas brancas.

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

#### 5.2.1. Bactéria

A bactéria isolada resultou em colônias com formato de cocos e no arranjo de estreptococos, Gram positivo, catalase negativa, gás de glicose negativa, assim foi classificado com o gênero de *Streptococcus* sp.

#### 5.2.2. Leveduras

Foram isoladas duas leveduras com características diferentes.

A levedura 1, isolada das lagartas pretas, apresentou na identificação morfológica, uma configuração redonda e convexa no meio de cultura, reprodução por brotamento e a célula com formato ovóide com presença de pseudomicélios. Na identificação bioquímica apresentaram resultados: urease negativo, sacarose negativo, lactose negativo, glicose positivo, nitrato negativo, identificando como gênero *Candida* sp. Alguns gêneros de leveduras (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* e *Trichosporon*) podem ser identificados a partir de sua morfologia, assim como as do gênero *Candida* que é caracterizada pela presença de hifas ou pseudo-hifas. Porém o teste bioquímico é necessário tanto para estabelecer de fato o gênero ou espécie de leveduras, quanto para comprovar a análise morfológica macroscópica (ANVISA, 2018; PEREIRA, 2019).

Para a levedura 2, isolada das lagartas brancas foi identificado na morfologia uma configuração redonda, inteira, convexa, reprodução por brotamento multilateral e forma de célula vegetativa globosa. Na identificação bioquímica apresentaram resultados: urease negativo, sacarose positivo, glicose positivo, lactose positivo, nitrato negativo, identificado com o gênero *Brettanomyces* sp que pertence à família da *Saccharomycetaceae*. Leveduras desta família são conhecidas principalmente por sua capacidade fermentativa de açúcares, sendo concomitante com as características positivas observadas nos resultados obtidos a partir do teste bioquímico (MILANI, 2015).

### **5.2.3 Microsporídio**

A identificação do microsporídio foi realizada em conjunto com uma empresa privada, ao passo que foi requerido sigilo a respeito da divulgação da espécie identificada.

## **5.3 INDUÇÃO DA CONTAMINAÇÃO – POSTULADO DE KOCH**

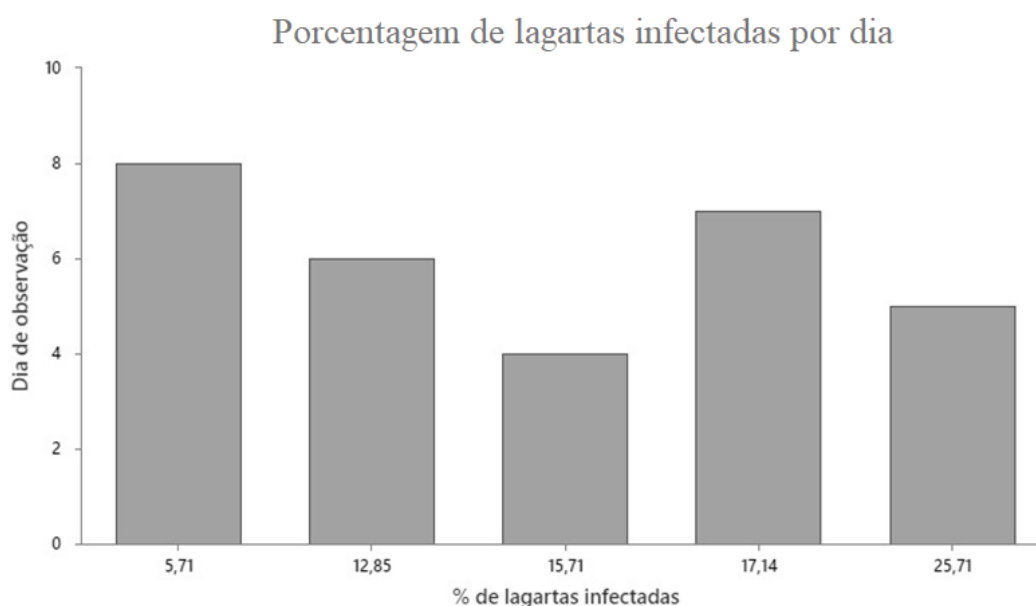
### **5.3.1 Microsporídio**

A partir da indução da contaminação com o microsporídio, a observação diária tornou possível estabelecer a evolução sintomática das lagartas. As quais apresentaram os mesmos sintomas aparentes daquelas advindas da criação.

A aparição dos sintomas aconteceu a partir do quarto dia de experimento, em que 15,71% das lagartas começaram a demonstrar sinais como: coloração preta nas extremidades do corpo (cabeça, parte inicial do tórax e parte final do abdome) e

movimentação lenta. No quinto dia, 14 lagartas (20%) vieram à óbito e seus corpos apresentavam coloração preta, além de epiderme que se rompia facilmente tornando visível a hemolinfa escura e com odor característico; outros 5,71% demonstraram movimentação lenta e rigidez nas extremidades do corpo. No sexto dia, nove lagartas (12,85%) foram encontradas mortas com o corpo totalmente endurecido e colocação branco leitoso, na parte ventral apresentavam a epiderme transparente. No sétimo, 17,14% (12 lagartas) apresentaram as mesmas características e outros 5,71% (quatro), demonstravam movimentação lenta e rigidez nas extremidades do corpo. Ao oitavo dia, mais 4 lagartas (5,71%) estavam mortas com sintomas similares aos citados anteriormente, totalizando 55,71% de lagartas mortas infectadas por microsporídeo.

A partir do nono dia de experimento, não foram observadas mais mortes ou sintomas de infecção. Ao 12º dia, 44,28% de pupas estavam formadas. Na Figura 2 é possível observação a porcentagem de lagartas infectadas, seja a partir da demonstração de sintomas ou morte, em relação aos dias de observação.



**Figura 2.** Gráfico representativo da relação entre a porcentagem de lagartas infectadas e os dias de observação do experimento.

Conforme observado, lagartas pretas apresentaram sintomas e morte antes de lagartas brancas. As pretas demonstraram sintomas aparentes nos 4º e 5º dias de

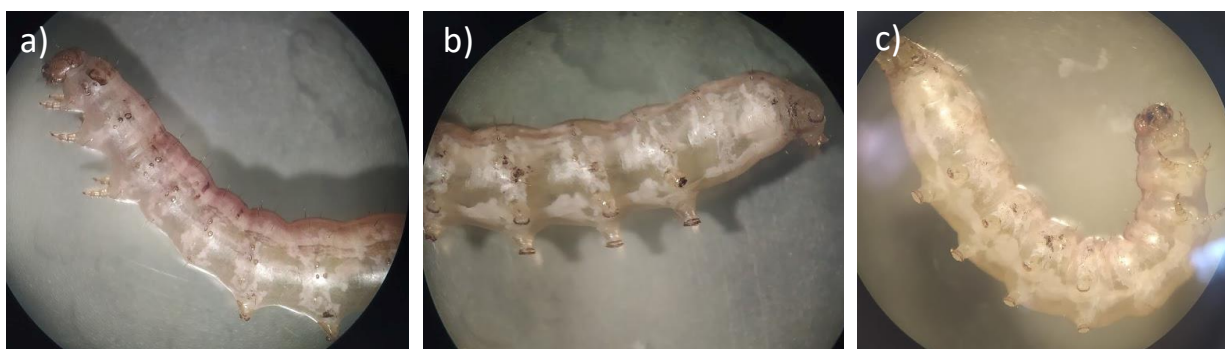
experimento, totalizando 20% de morte; enquanto as brancas foram sintomáticas entre os 5º e 7º dias, representando 35,71% de morte. Independente dos sintomas apresentados, as lagartas morreram entre o terceiro e quarto ínstar. Além disso, a evolução dos sintomas também ocorreu de forma diferente entre lagartas brancas e pretas.

Lagartas que morreram pretas (Figura 3), demonstravam de início escurecimento das extremidades do corpo (cabeça, parte inicial do tórax e parte final do abdome), além de movimentação lenta. Com o passar das horas, o corpo escurecia por completo, das extremidades até a região central. Apresentavam também, ao morrerem, epiderme extremamente sensível que se rompia facilmente e evidenciava a hemolinfa escura com odor característico.



**Figura 3.** Evolução sintomática de lagartas pretas provenientes do tratamento 2 (microsporídio), em: a) extremidade final do abdome preta e escurecimento da cabeça; b) escurecimento quase total do corpo da lagarta e hemolinfa escura (destaque); c) todo o corpo da lagarta com coloração preta.

Em contrapartida, lagartas que morreram brancas (Figura 4) demonstravam, primeiramente, movimentação lenta e rigidez nas extremidades do corpo. Com o passar das horas, todo o corpo se tornava rígido e a epiderme transparente, deixando visível estruturas brancas no interior da lagarta. Esses sintomas são corroborados por Simões (2012), em sua tese de doutorado, ao descrever sintomas similares em lagartas contaminadas com microsporídio.



**Figura 4.** Evolução sintomática de lagartas brancas provenientes do tratamento 2 (microsporídio), em: a) visível rigidez da porção frontal da lagarta; b) rigidez da porção final da lagarta, sendo possível



observar epiderme transparente; c) rigidez total da lagarta, sendo possível observar a transparência da epiderme e estruturas internas.

Além de avaliar o comportamento das lagartas contaminadas com microsporídio, também foi possível observar os insetos adultos. Apenas 25,71% de mariposas completaram a metamorfose sendo que um macho demonstrou deformidades nas asas (Figura 5).

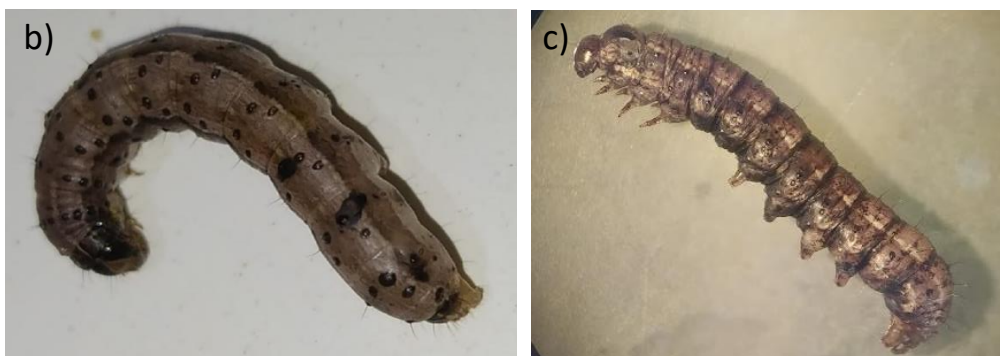


**Figura 5.** Mariposas provenientes do tratamento 2 (microsporídio) com deformidades na asa como mostra o destaque.

Há diferentes fatores que podem culminar em deformações nas asas de mariposas, tal fato é relativamente comum em *Spodoptera* ao alterar a dieta da lagarta (PINTO et al., 2019) e ao se desenvolver em temperaturas não ideais ou em local com temperatura não constante (SAMPAIO et al., 2020).

Também foi possível notar que algumas lagartas, independente de pretas ou brancas, apresentavam manchas de necrose na epiderme (Figura 6). Simões (2012) também relata a ocorrência de necrose na epiderme de lagartas infectadas com microsporídio.





**Figura 6.** Pontos de necrose comumente encontrados em lagartas doentes, em a) parte ventral da lagarta, próximos às pernas; b) na região posterior dorsal; c) em todo o corpo da lagarta.

### 5.3.2 Leveduras

Os tratamentos referentes às infecções por leveduras não apresentaram sintomas de contaminação ou morte das lagartas, apenas adultos com deformidades nas asas. Como citado anteriormente, essas deformações podem ter sido causadas devido a alteração da dieta, pela presença do contaminante, ou por possível variação de temperatura do ambiente (PINTO et al., 2019; SAMPAIO et al., 2020). A porcentagem de adultos provenientes da inoculação com *Candida* sp foi de 82,85%, enquanto a inoculação com *Brettanomyces* sp, resultou em 87,14% de adultos.



**Figura 7.** Mariposas provenientes dos tratamentos com leveduras que apresentaram deformações nas asas.

### 5.3.3 Bactéria

Assim como no tratamento com as leveduras, o tratamento com *Streptococcus* sp não apresentou mortes ou sintomas característicos de infecção, resultando em 85,71% de mariposas. Também foi observado deformações nas asas de um adulto.



**Figura 8.** Mariposa proveniente do tratamento 5 (bactéria) que apresentou deformações nas asas.

### 5.3.4 Testemunha

No tratamento controle, ou testemunha, as 70 lagartas empuparam, sendo que emergiram 68 (97,14%) mariposas e todas saudáveis (Figura 9).



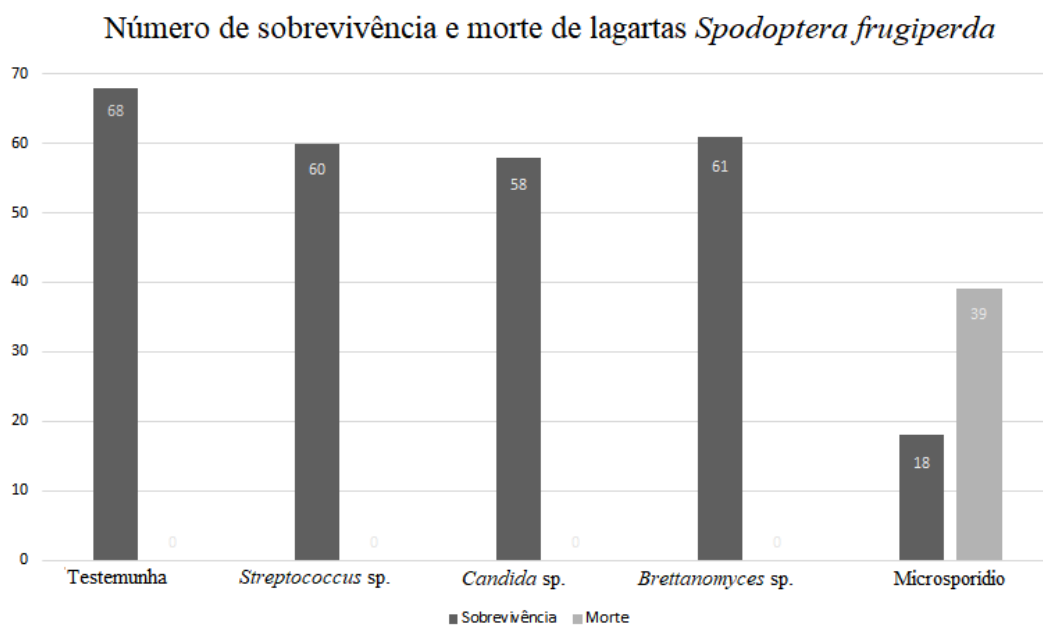
**Figura 9.** Exemplar de mariposa saudável, sem deformações, proveniente do tratamento 1 (testemunha).

Na Tabela 2 é possível observar os principais parâmetros analisados a partir dos resultados obtidos com a indução da infecção pelos diferentes microrganismos utilizados. O tratamento 2, decorrente da inoculação de microsporídio na dieta artificial das lagartas, demonstrou menor porcentagem de mariposas e, portanto, maior porcentagem de contaminação. Neste tratamento foi possível observar a evolução dos sintomas que antes foram visíveis nas lagartas da criação industrial, sendo possível identificar o microrganismo responsável pela infecção inicial presente na criação industrial de *Spodoptera frugiperda*. Enquanto os demais tratamentos, apesar de apresentarem, com

exceção do tratamento 4 (*Brettanomyces* sp), mariposas com deformação nas asas, demonstram mais de 80% de viabilidade do adulto. Além disso, o número de indivíduos mortos e de sobreviventes é observado na Figura 10.

**Tabela 2.** Demonstração de todos os tratamentos a partir do número amostral de cada um, sendo analisado a presença de sintomas, porcentagem de mariposas e quantidade de mariposas com deformação nas asas.

Tratamentos	Nº amostral	Apresentaram sintomas?	% de mariposas	Nº de mariposas com deformações nas asas
Testemunha	70	Não	97,14	0
Microsporídio	70	Sim (lagartas brancas e pretas)	25,71	1
<i>Candida</i> sp.	70	Não	82,85	2
<i>Brettanomyces</i> sp.	70	Não	87,14	0
<i>Streptococcus</i> sp.	70	Não	85,71	2



**Figura 10.** Relação entre a quantidade de sobrevivência e morte de *Spodoptera frugiperda* exposta a diferentes microrganismos.

O Teste de Qui-Quadrado foi realizado com o intuito de observar se as frequências observadas são equivalentes às frequências esperadas, desta maneira a quantidade de sobreviventes e de mortes de cada tratamento foi analisada. O valor do  $\chi^2$  calculado, obtido a partir dos dados amostrais, foi de 193,88 enquanto o  $\chi^2$  tabelado, foi de 9,48. Tendo isso em vista, é possível rejeitar a hipótese de que as frequências observadas são equivalentes aquelas esperadas (Apêndice A).

De acordo com Yuning et al. (2022), bactérias e leveduras dos gêneros *Streptococcus* e *Candida*, respectivamente, são microrganismos originários da microbiota do organismo de *Spodoptera frugiperda*, tal fato é confirmado por Pandey e Rajagopal (2019) se tratando de *S. litura*. O que justifica os resultados apontados no presente trabalho referentes a não infecção por leveduras e bactéria em lagartas *S. frugiperda*.

### 5.3 CONTAGEM DE ESPOROS

A partir da contagem dos esporos presentes em lagartas contaminadas com microsporídio, foi possível obter o valor de  $8 \times 10^3$  esporos/mm<sup>3</sup> em lagartas brancas, enquanto nas lagartas pretas foi de  $6,4 \times 10^3$  esporos/mm<sup>3</sup> (Tabela 3). O resultado dos testes simultâneos de Tukey para as diferenças das médias da contagem de esporos em lagartas pretas e brancas, demonstra que as médias diferem significativamente entre si (Figura 10).

A quantidade de esporos encontrados nas lagartas contaminadas representa uma alta taxa de patógeno presente, justificando a alta porcentagem de morte causada pelo microsporídio.

**Tabela 3.** Contagem de esporos em lagartas contaminadas com microsporídio, representando valor de F e p.

<b>Característica da lagarta</b>	<b>Quantidade de esporos/mm<sup>3</sup></b>	<b>Valor de F</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Branca</b>	$8 \times 10^3$	21,95	0,00001*
<b>Preta</b>	$6,4 \times 10^3$	4,7037	0,005728*

\*valores de  $p < 0,05$ .

Segundo estudo realizado por Wiese (1974) o nível fatal para abelhas é de  $1 \times 10^6$  esporos/mm<sup>3</sup> quando se trata de nosemose, microsporídio mais presente na bibliografia atual. Enquanto Simões (2012) realizou experimentos com diferentes taxas de infecção por microsporídio em *D. saccharalis* e determinou que valores de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^7$  esporos/lagartas representam mais de 90% de mortalidade no inseto.

## 5.4 TRATAMENTO COM FÁRMACOS

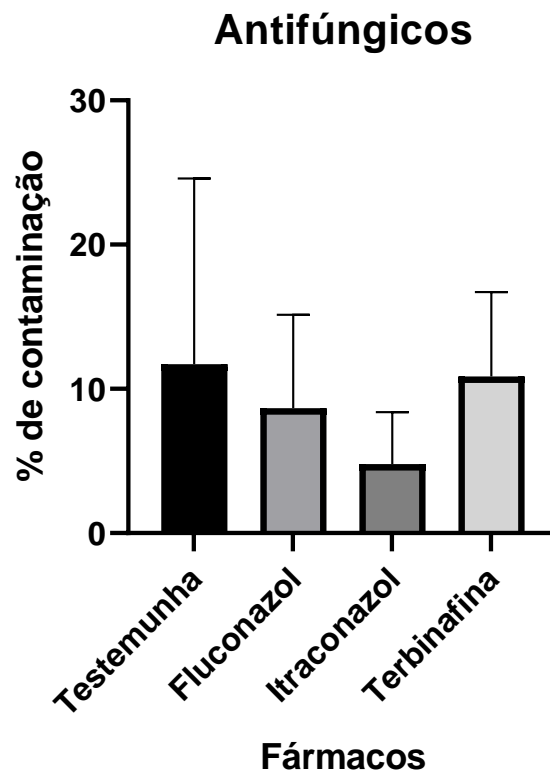
### 5.4.1 Antifúngicos

A partir dos antifúngicos utilizados (Itraconazol, Terbinafina e Fluconazol), foi possível determinar a porcentagem na formação de pupas e de mariposas, além da porcentagem de contaminação presente em cada tratamento. Demonstrando, então, a eficácia dos medicamentos no controle da contaminação aparente em *S. frugiperda* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Porcentagem de formação de pupa, emergência de mariposa e de infecção em tratamentos utilizando fármacos antifúngicos para controle de contaminação em *Spodoptera frugiperda*.

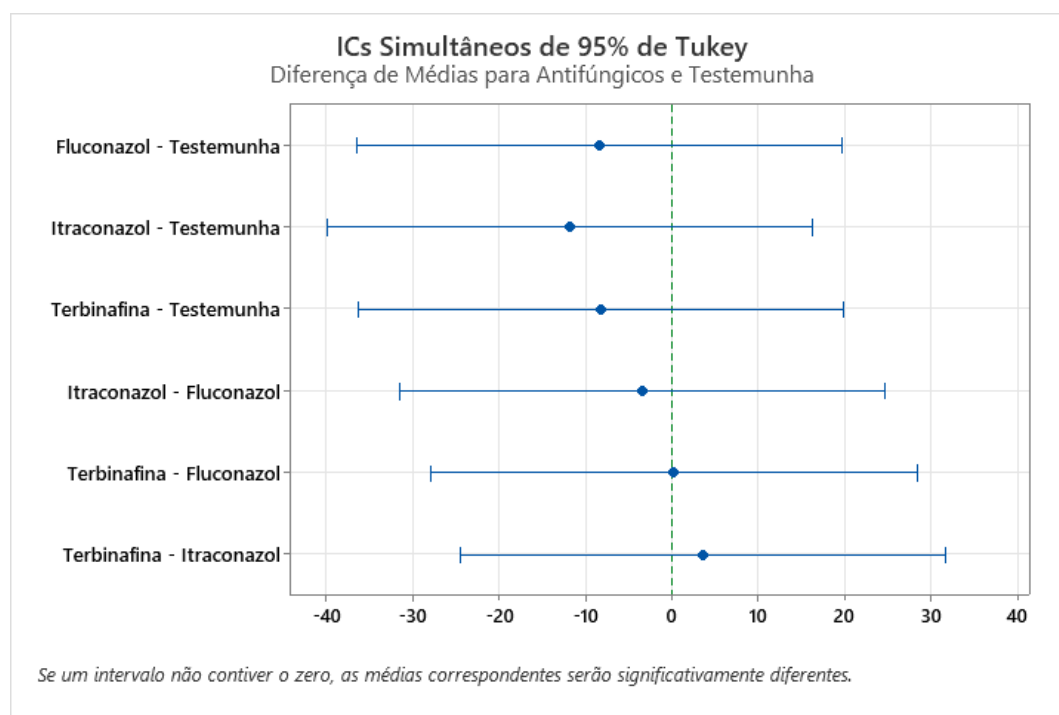
	<b>% pupa</b>	<b>% mariposa</b>	<b>% contaminação</b>
<b>Testemunha</b>	89,55	83,17	11,72
<b>Fluconazol</b>	91,37	82,51	8,66
<b>Itraconazol</b>	95,22	86,65	4,8
<b>Terbinafina</b>	89,08	74,22	10,87

A partir dos dados obtidos, foi possível demonstrar o nível de infecção nos tratamentos utilizando antifúngicos (Figura 11).



**Figura 11.** Resultado da porcentagem de contaminação em cada tratamento com fármacos antifúngicos, visando o controle da contaminação causada por microrganismo em *Spodoptera frugiperda*. As barras presentes no gráfico representam o desvio padrão de cada tratamento.

Os antifúngicos Itraconazol, Fluconazol e Terbinafina, apresentaram diferença percentual de 6,92, 3,06 e 0,85%, respectivamente, em relação ao grupo testemunha. O resultado dos testes simultâneos de Tukey para as diferenças das médias de contaminação em lagartas presentes nos tratamentos com Fluconazol, Itraconazol, Terbinafina e grupo testemunha, não diferem significativamente entre si (Figura 12) (Apêndice B).



**Figura 12.** Diferença das médias de contaminação de lagartas dos tratamentos com Fluconazol, Itraconazol, Terbinafina e grupo Testemunha.

Kloezen et al. (2018) apresentam resultados contrários aos apresentados por esse trabalho ao realizarem pesquisas a respeito dos efeitos de Itraconazol e Terbinafina em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Madurella micetomatis*. Em seu trabalho, demonstram que o fármaco Terbinafina teve melhor desempenho que Itraconazol no que se diz respeito a prolongar a vida do inseto infectado pelo fungo. No presente trabalho, Itraconazol apresenta desempenho semelhante à Terbinafina no controle da infecção em *Spodoptera frugiperda*, uma vez que as médias não diferem entre si.

#### 5.4.2 Antibacterianos

Os antibacterianos utilizados foram Tetraciclina e Metronidazol, sendo que para este último foram realizadas três diferentes dosagens. Desta maneira, as dosagens utilizadas foram, respectivamente: Metronidazol 1 = 400mg; Metronidazol 2 = 2g; e Metronidazol 3 = 5g. Sendo assim, foram analisadas as porcentagens de infecção em cada tratamento, comparada com o tratamento testemunha.



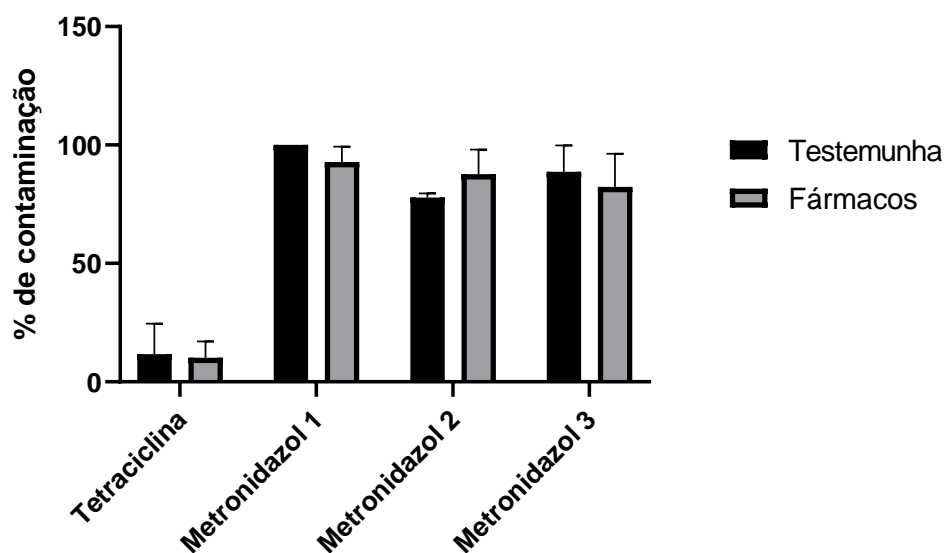
Devido à alta taxa de contaminação em todos os tratamentos de Metronidazol, não foi possível obter as porcentagens de pupas e mariposas destes tratamentos. Porém, as porcentagens de Tetraciclina estão presentes na Tabela 7.

**Tabela 5.** Porcentagem de formação de pupa, emergência de mariposa e de infecção em tratamentos utilizando Tetraciclina para controle de contaminação em *Spodoptera frugiperda*.

	% pupa	% mariposa	% contaminação
<b>Testemunha</b>	89,55	83,17	11,72
<b>Tetraciclina</b>	89,83	78,06	10,2

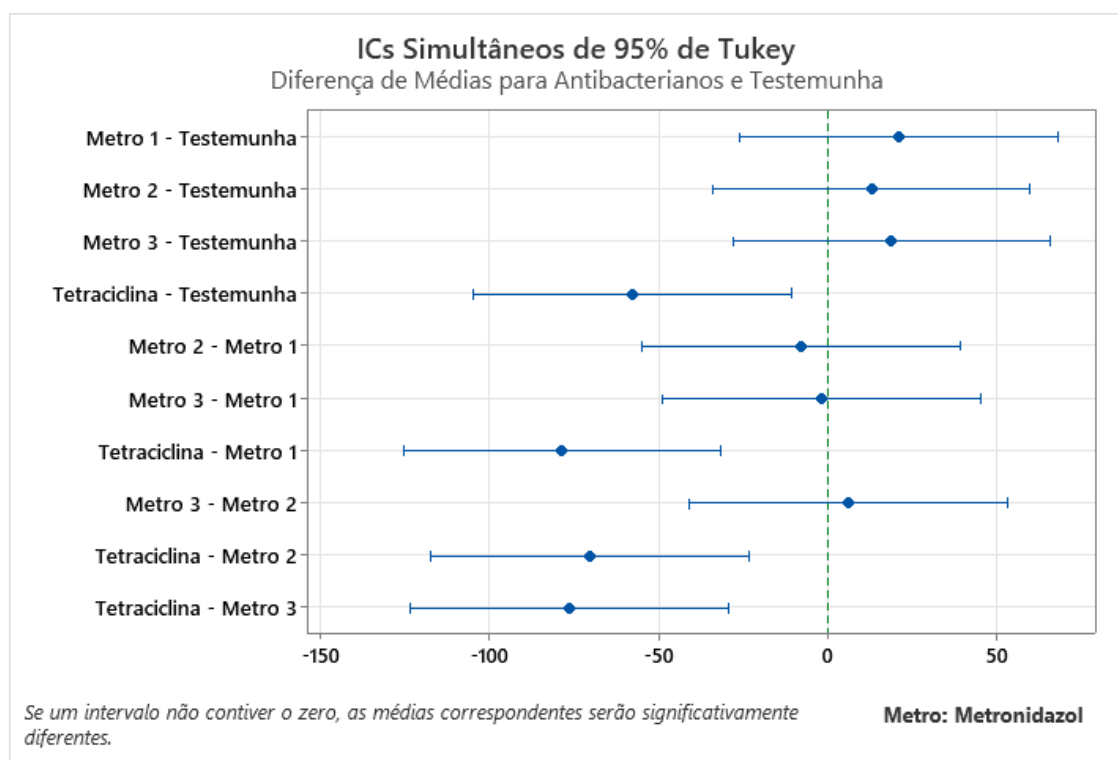
Apesar da baixa porcentagem de infecção presente no tratamento com Tetraciclina (10,2%), Metronidazol 1, 2 e 3 demonstraram contaminação de 100, 77,8 e 88,68% de infecção, respectivamente, porém, não diferindo significativamente do grupo testemunha de cada um destes tratamentos (Figura 13).

### Antibacterianos



**Figura 13.** Resultado da porcentagem de infecção em cada tratamento com fármacos antibacterianos, visando o controle da infecção causada por microrganismo em *Spodoptera frugiperda*.

O resultado dos testes simultâneos de Tukey para as diferenças das médias de contaminação em lagartas presentes nos tratamentos com Metronidazol 1, Metronidazol 2, Metronidazol 3 e grupo testemunha, não diferiram significativamente entre si, assim como as médias dos diferentes tratamentos com Metronidazol. Enquanto a Tetraciclina apresenta média significativamente diferente entre Testemunha, Metronidazol 1, Metronidazol 2 e Metronidazol 3 (Figura 14) (Apêndice C).



**Figura 14.** Diferença das médias de contaminação de lagartas dos tratamentos com Tetraciclina, Metronidazol 1, Metronidazol 2, Metronidazol 3 e grupo Testemunha.

Em um estudo realizado por Simões (2012), evidenciou a aplicação de diferentes medicamentos para controle de lagartas de *Diatraea saccharalis* infectada com microsporídeo. Um dos medicamentos utilizados, foi o metronidazol, o qual demonstrou baixa taxa de tratamento à contaminação, chegando até 96% de mortalidade. Fato confirmado pelo presente trabalho, em que Metronidazol 1 chegou a 100% de mortalidade.

## 6. CONCLUSÃO

O postulado de Koch foi eficiente para determinar os microrganismos causadores de infecção na criação comercial de *Spodoptera frugiperda*, tendo em vista que com a aplicação do mesmo, toda evolução sintomática observada na criação pode ser observada novamente.

A quantidade de esporos quantificada em lagartas brancas e pretas infectadas por microsporídio, demonstra uma taxa capaz de causar a morte, a partir do terceiro dia em contato com o patógeno, de 74% de lagartas.

Os fármacos Metronidazol, Tetraciclina, Terbinafina, Itraconazol e Fluconazol não foram eficientes para controle da infecção das lagartas da criação de *S. frugiperda*.

Ao identificar e estudar os microrganismos causadores da mortalidade na criação comercial de *S. frugiperda*, as leveduras e bactéria não foram as responsáveis pela doença presente na criação original. A confirmação partir dos Postulados de Koch, demonstrou que o microsporídio foi o microrganismo com maior potencial patogênico e que deve ser melhor estudado em trabalhos futuros.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde** – Módulo 5: Tecnologia em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos, 2013.
- BOTELHO, A. B. R. Z.; SILVA, I. F.; ÁVILA, C. J. Aspectos biológicos da lagarta-falsa-medideira e sua criação em laboratório com dieta artificial. **EMBRAPA - Circular Técnica** 47, Dourados/MS, 2019, 24p.
- BOTTEON, V. W. **Controle de Qualidade em Entomologia**. Artigo LinkedIn, publicado em 2018. Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/control-de-qualidade-em-entomologia-victor-wilson-botteon/?originalSubdomain=pt> Acesso em: 26/09/2022
- BUENO, V. H. P. Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. **UFLA**, Lavras, MG. 2000, 206p.
- BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; NÖRNBERG, S. D. Consumo e utilização de alimentos por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas temperaturas. **Ciênc. agrotec.** v. 28, n. 6, p. 1278-1283, 2004.
- CHÁVEZ, D.; TORRES, L.; PARÍS, A.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A. Evaluation of native isolates of *Nomuraea rileyi* for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev Colomb Entomol**, v. 30, p. 93–97, 2004.
- COHEN, A. C. Ecology of Insect Rearing Systems: A mini-review of insect rearing Papers from 1906-2017. **Advances in Entomology**, v. 6, n. 2, p. 86-115, 2018.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **Circular Técnica, 21 - Embrapa**, Sete Lagoas - MG. CNPMS. 45p., 1995.
- DAY, R.; ABRAHAMS, P.; BATEMAN, M.; BEALE, T.; CLOTTEY, V.; COCK, M.; COLMENAREZ, Y.; CORNIANI, N.; EARLY, R.; GODWIN, J.; GOMEZ, J.; MORENO, P. J.; MURPHY, S. T.; OPPONG-MENSAH, B.; PHIRI, N.; PRATT, C.; SILVESTRI, S.; WITT, A. Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Manag**, v. 28, p. 196–201, 2017.
- EILENBERG, J.; VLAK, J. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; CAPPELLOZZA, S.; JENSEN, A. B. Diseases in insects produced for food and feed. **Journal of Insects as Food and Feed**, Wageningen, v. 1, p. 87-102, 2015.
- FORD, S. M. **Farmacologia clínica** - 11. ed. - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2019.
- FRONZA, E.; SPECHT, A.; HEINZEN, H., DE-BARROS, N. M. *Metarhizium* (Nomuraea) *rileyi* as biological control agent. **Biocontrol Sci Technol**, v. 27, p. 1243–1264, 2017.
- GARCÍA, C.; BAUTISTA, A. N. Pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Colomb Entomol Rev**, v. 37, p. 217–222, 2011.

GHOSH, K.; WEISS, L.M. T cell response and persistence of the microsporidia. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, p. 748–760, 2012.

GOERING, R. V.; DOCKRELL, H. M.; ZUCKERMAN, M.; CHIODINI, P. L. **Mims Microbiologia Médica e Imunologia** - 6 ed. - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2020.

GRENIER, S. Artificial rearing of entomophagous insects, with emphasis on nutrition and parasitoids - general outlines from personal experience. **Karaelmas Science and Engineering Journal**, Istanbul, v. 2, p. 1-12, 2012.

KLOEZEN, W.; PAREL, F.; BRUGGEMANN, R.; ASOUI, K.; POPPEL M. H.; FAHAL, A.; MOUTON, J.; VAN DE SANDE, W. Amphotericin B and terbinafine but not the azoles prolong survival in *Galleria mellonella* larvae infected with *Madurella mycetomatis*. **Medical Mycology**, v. 56, n. 4, 2018.

LI-MEI, H.; TENG-LI, W.; YU-CHAO, C.; SHI-SHUAI, G. WYCKHUYS, K. A. G.; KONG-MING, W. Larval diet affects development and reproduction of East Asian strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Science Direct**, n. 20, v. 3, p. 736-744, 2021.

MACHADO, O. V. O.; PATROCÍNIO, M. C. A.; MEDEIROS, M. S.; BANDEIRA, T. J. P. G. **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas**. Editora Unichristus, Fortaleza, 2019.

MALDONADO, H. A.; POLANÍA, I. Z. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, Calle, v. 13, p. 163-173, 2010.

MILANI, L. M. **Análise do metabolismo de leveduras isoladas de lagartas (*Spodoptera frugiperda*) visando a otimização da produção de etanol de 2ª e 3ª gerações**. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental, Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, Universidade Federal da Fronteira Sul, 2015.

MONTEZANO, D.G.; SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; ROQUE-SPECHT, V.F.; SOUSA-SILVA, J.C.; PAULA-MORAES, S.V.; PETERSON, J.A.; HUNT, T.E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v.26,n.2, p.286-300, 2018.

MORETTO, M. M.; HARROW, D. I.; KHAN, I. A. Effector CD8 T cell immunity in microsporidial infection: A lone defense mechanism. **Semin. Immunopathol.** v. 37, p. 281–287, 2015.

NAGOSHI R.N.; KOFFI D.; AGBOKA K.; TOUNOU K.A.; BANERJEE, R.; JURAT-FUENTES, J. L.; MEAGHER, R.L. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. **PLoS One**. p.1–15, 2017.

NALIM, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. Tese de Doutorado em Entomologia, Orientador: José Roberto Postali Parra - Universidade de São Paulo, 1991.

NIASSY, S.; AGBODZAVU, M. K.; KIMATHI, E.; MUTUNE, B.; ABDEL-RAHMAN, E. F. M.; SALIFU, D.; HAILU, G.; BELAYNEH, Y. T.; FELEGE, E.; TONNANG, H. E. Z.; EKESI, S.; SUBRAMANIAN, S. Bioecology of fall armyworm *Spodoptera*

*frugiperda* (J. E. Smith), its management and potential patterns of seasonal spread in Africa. **PLoS ONE**, v.16, n.6, 2021

OCHOA, G.; ARRIVILLAGA, J. *Bacillus thuringiensis*: Advances and perspectives in the biological control of *Aedes aegypti*. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 59, p. 181–191, 2009.

PAN, G.; BAO, J.; MA, Z.; SONG, Y.; HAN, B.; RAN, M.; LI, C.; ZHOU, Z. Invertebrate host responses to microsporidia infections. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 18, p 104-113, 2018.

PANDEY, N.; RAJAGOPAL, R. Comparative Analysis of the Difference in the Midgut Microbiota between the Laboratory Reared and the Field-caught Populations of *Spodoptera litura*. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 47, n. 3, 2019.

PAREDES-SÁNCHEZ, F.; RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; MARTÍNEZ-PÁDRON, H. Y.; BERRONES-MORALES, M.; NIÑO-GARCÍA, N.; HERRERO-MAYORGA, V. Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. A Review. **Molecules**, v. 26, 2021.

PARRA, J. R. P. A biologia de insetos e o manejo de pragas: da criação em laboratório à aplicação em campo. In: GUEDES, J. V. C.; COSTA, I. D. da; CASTIGLIONI, E. (Eds.). **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, p. 1 – 29, 2000.

PARRA, J. R. P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 6a ed. Piracicaba: **ESALQ/FEALQ**, Piracicaba/SP, 6 ed., 2001, 134p.

Parra, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. FEALQ, Piracicaba. 2. ed., n. 4. p.1015-1038, 1998.

PARRA, J.R.P.; COELHO, A., JR. Insect Rearing Techniques for Biological Control Programs, a Component of Sustainable Agriculture in Brazil. **Insects**, v. 13, n. 1, p. 105-123, 2022.

PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, p. 37- 90, 2009.

PEREIRA, S. L. P. **Avaliação do desempenho das Lagartas *Spodoptera frugiperda* após contaminação por bactérias e leveduras**. Orientadora: Mônica Hitomi Okura. Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019.

PINTO, J. R. L.; TORRES, A. F.; TRUZI, C. C.; VIEIRA, N. F.; VACARI, A. M.; BORTOLI, S. A. Artificial Corn-Based Diet for Rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal os Insect Science**, v. 19, n. 4, p. 1-8, 2019.

PRASANNA, B.; HUESING, J.; EDDY, R.; PESCHKE, V. Fall Armyworm in Africa: A Guide for Integrated Pest Management. **CAB International**, Wallingford. p. 109, 2018.

ROMERO-ARENAS, O.; RIVERA, A.; ARAGON, A.; PARRAGUIRRE, C.; CABRERA, E.; LOPEZ, F. Mortality evaluation of armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) by using *Metarhizium anisopliae* in vitro. **J Pure Appl Algebr**, v. 8, p. 59–67, 2014.

SAMPAIO, F.; KRECHMER, F. S.; MARCHIORO, C. A. Temperature-dependent development models describing the effects of temperature on the development of *Spodoptera eridania*. **Pest Management Science**, 2020.

SHYLESHA, A. N.; SRAVIKA, A. Natural occurrence of predatory bugs, *Eocanthecona furcellata* (Wolff) and *Andrallus spinidens* (Fabr.) on *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Hemiptera: Pentatomidae) in maize and their potential in management of fall armyworm. **Journal of Biological Control**, v. 32, p. 209–211, 2018.

SIMÕES, R. A. **Alterações nos parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) causadas por *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae)**. Orientador: Italo Delalibera Júnior. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2012.

SORENSEN, J. G.; ADDISON, M. F.; TERBLANCHE, J. S. Mass-rearing of insects for pest management: Challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection**, v. 38, p. 87–94, Aug. 2012

SOUSA, W. B. **Caracterização do *Baculovirus spodoptera* quanto as variações de pH e temperatura**. Dissertação de mestrado em Inovação Tecnológica, Orientadora: Mônica Hitomi Okura - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2015.

STINGUEL, P. **Estudo biológico e comportamental de lagartas de *Spodoptera frugiperda* visando à produção de *Baculovirus spodoptera***. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal, Orientador Hugo José Gonçalves dos Santos Junior, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre/ES, 2016.

SUN, XIAO-XU; HU, CHAO-XING; JIA, HUI-RU; WU, QIU-LIN; SHEN, XIU-JING; ZHAO, SHENG-YUAN; JIANG, YU-YING; WU, KONG-MING. Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 3, p. 664–672, 2021.

TRIVELLATO, G.F. Aspectos biológico e suas implicações na qualidade da produção massal de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R. Controle Biológico de Pragas da Agricultura, Capítulo 7. **EMBRAPA**, Brasília, p. 203-238, 2020.

VALICENTE, F. H. Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, **Circular Técnica**, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2022

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Práticas de Microbiologia – 2. ed. Rio de Janeiro, **Ganabara Koogan**, 256p, 2019.

WAN, J.; CONG, H.; CHANG-YOU, L.; HONG-XU, Z.; YONG-LIN, R.; ZAI-YUAN, L.; LONG-SHENG, X.; BIN, Z.; XI, Q.; BO, L.; CONG-HUI, L.; WAN-XUE, L.; WEN-KAI, W.; WAN-QIANG, Q.; MCKIRDY, S.; FANG-HAO, W. Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **ScienceDirect**, v. 30, n. 3, p. 646-663, 2021.

YUNING, L.; LUYANG, LIU; XUEMING, C.; XIANMEI, Y.; JINTIAN, L.; BENSUI, SHU. The bacterial and fungal communities of the larval midgut of *Spodoptera*

*frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) varied by feeding on two cruciferous vegetables. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

WIESE, H. Primeira curva de esporulação de *Nosema apis* Zander no estado de Santa Catarina, Brasil. **CBA**, p. 211-214, 1974.



## APÊNDICE A – Teste Qui-Quadrado

Linhas: Tratamento Colunas: Colunas da worksheet

	Sobrevivência	Morte	Todos
Testemunha	68	0	68
	59,276	8,724	
Streptococcus sp.	60	0	60
	52,303	7,697	
Candida sp.	58	0	58
	50,559	7,441	
Brettanomyces sp.	61	0	61
	53,174	7,826	
Microsporídeo	18	39	57
	49,688	7,313	
Todos	265	39	304

*Conteúdo da Célula*  
*Contagem*  
*Contagem esperada*

### Teste qui-quadrado

	Qui-Quadrado	GL	Valor-p
Pearson	193,872	4	0,000
Razão de verossimilhança	161,842	4	0,000

## APÊNDICE B – Teste de Tukey Antifúngicos

### Método

Hipótese nula	Todas as médias são iguais
Hipótese alternativa	Nem todas as médias são iguais
Nível de significância	$\alpha = 0,05$

*Assumiu-se igualdade de variâncias para a análise*

### Informações dos Fatores

Fator	Níveis	Valores
Fator	4	Testemunha; Fluconazol; Itraconazol; Terbinafina

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	3	377,0	125,7	0,52	0,673
Erro	16	3846,8	240,4		
Total	19	4223,8			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
15,5056	8,93%	0,00%	0,00%

### Médias

Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%
Testemunha	5	16,2	29,0	(1,5; 30,9)
Fluconazol	5	7,80	9,15	(-6,90; 22,50)
Itraconazol	5	4,40	4,77	(-10,30; 19,10)
Terbinafina	5	8,00	3,54	(-6,70; 22,70)

*DesvPad Combinado = 15,5056*

### Comparações Emparelhadas de Tukey

#### Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e 95% de Confiança

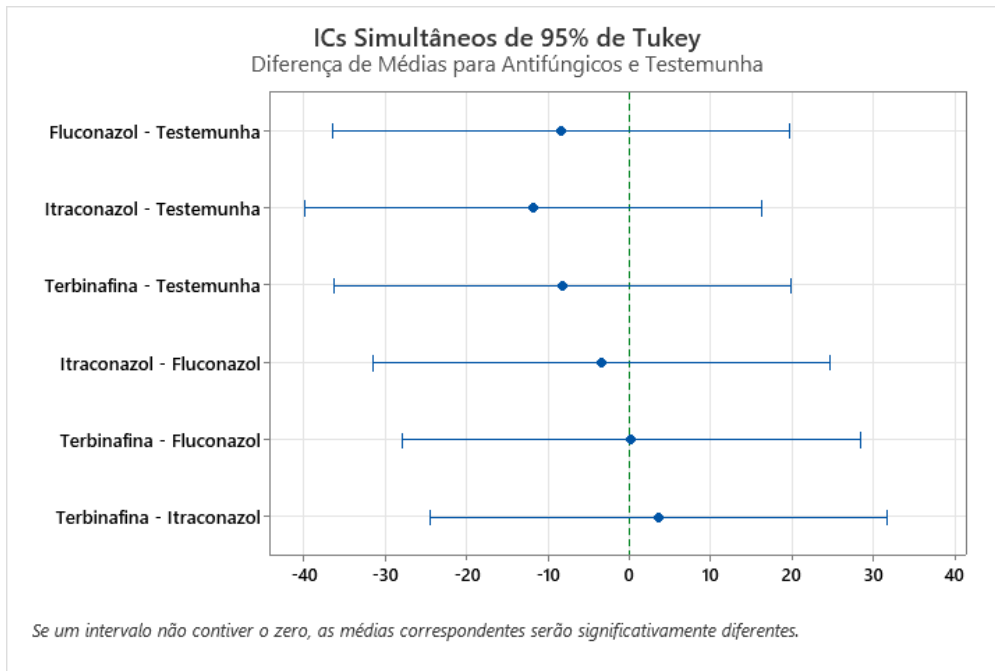
Fator	N	Média	Agrupamento
Testemunha	5	16,2	A
Terbinafina	5	8,00	A
Fluconazol	5	7,80	A
Itraconazol	5	4,40	A

*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.*

### Testes Simultâneos de Tukey para Diferenças de Médias

Diferença de Níveis	Diferença de Médias	EP da Diferença	IC de 95%	Valor-T	Valor-P Ajustado
Fluconazol – Testemunha	-8,40	9,81	(-36,48; 19,68)	-0,86	0,827
Itraconazol – Testemunha	-11,80	9,81	(-39,88; 16,28)	-1,20	0,634
Terbinafina - Testemunha	-8,20	9,81	(-36,28; 19,88)	-0,84	0,837
Itraconazol – Fluconazol	-3,40	9,81	(-31,48; 24,68)	-0,35	0,985
Terbinafina – Fluconazol	0,20	9,81	(-27,88; 28,28)	0,02	1,000
Terbinafina – Itraconazol	3,60	9,81	(-24,48; 31,68)	0,37	0,982

*Nível de confiança individual = 98,87%*



## APÊNDICE C – Teste de Tukey Antibacterianos

### Método

Hipótese nula	Todas as médias são iguais
Hipótese alternativa	Nem todas as médias são iguais
Nível de significância	$\alpha = 0,05$

Assumiu-se igualdade de variâncias para a análise

### Informações dos Fatores

Fator	Níveis	Valores
Fator	5	Testemunha; Metronidazol I; Metronidazol II; Metronidazol III; Tetraciclina

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	4	17095	4273,7	9,26	0,001
Erro	15	6924	461,6		
Total	19	24019			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
21,4845	71,17%	63,49%	48,75%

### Médias

Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%
Testemunha	4	72,8	38,2	(49,9; 95,6)
Metronidazol I	4	93,50	7,59	(70,60; 116,40)
Metronidazol II	4	85,5	20,5	(62,6; 108,4)
Metronidazol III	4	91,50	12,77	(68,60; 114,40)
Tetraciclina	4	15,00	14,31	(-7,90; 37,90)

DesvPad Combinado = 21,4845

### Comparações Emparelhadas de Tukey

#### Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e 95% de Confiança

Fator	N	Média	Agrupamento
Metronidazol I	4	93,50	A
Metronidazol III	4	91,50	A
Metronidazol II	4	85,5	A
Testemunha	4	72,8	A
Tetraciclina	4	15,00	B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

### Testes Simultâneos de Tukey para Diferenças de Médias

Diferença de Níveis	Diferença de Médias	EP da Diferença	IC de 95%	Valor-T	Valor-P Ajustado
Metronidazol - Testemunha	20,8	15,2	(-26,2; 67,7)	1,37	0,657
Metronidazol - Testemunha	12,8	15,2	(-34,2; 59,7)	0,84	0,914
Metronidazol - Testemunha	18,8	15,2	(-28,2; 65,7)	1,23	0,733
Tetraciclina - Testemunha	-57,8	15,2	(-104,7; -10,8)	-3,80	0,013
Metronidazol - Metronidazol	-8,0	15,2	(-54,9; 38,9)	-0,53	0,983
Metronidazol - Metronidazol	-2,0	15,2	(-48,9; 44,9)	-0,13	1,000
Tetraciclina - Metronidazol	-78,5	15,2	(-125,4; -31,6)	-5,17	0,001
Metronidazol - Metronidazol	6,0	15,2	(-40,9; 52,9)	0,39	0,994
Tetraciclina - Metronidazol	-70,5	15,2	(-117,4; -23,6)	-4,64	0,003
Tetraciclina - Metronidazol	-76,5	15,2	(-123,4; -29,6)	-5,04	0,001

Nível de confiança individual = 99,25%

