

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

Avaliação do desempenho das Lagartas *Spodoptera frugiperda* após
contaminação por bactérias e leveduras

Autora: Sarah Lúcia Pantaleão Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura

Uberaba

2019

Sarah Lúcia Pantaleão Pereira

Avaliação do desempenho das Lagartas *Spodoptera frugiperda* após
contaminação por bactérias e leveduras

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

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura

Uberaba
2019

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

P495a Pereira, Sarah Lúcia Pantaleão
Avaliação de desempenho das Lagartas *Spodoptera frugiperda* após
contaminação por bactérias e leveduras / Sarah Lúcia Pantaleão Pereira. --
2019.
52 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) --
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019
Orientadora: Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura

1. *Baculoviridae*. 2. Pragas agrícolas - Controle biológico. I. Okura,
Mônica Hitomi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 578.841:632.937

SARAH LÚCIA PANTALEÃO PEREIRA

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS LAGARTAS SPODOPTERA FRUGIPERDA APÓS
CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS E LEVEDURAS

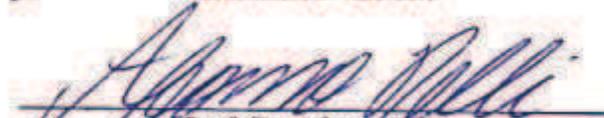
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 28 de novembro de 2019

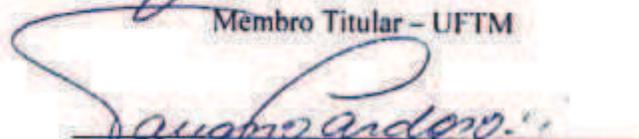
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura
Orientador – UFTM



Prof. Dr. Afonso Pelli
Membro Titular – UFTM



Prof. Dr. Taciano dos Reis Cardoso
Membro Titular – FPM

Dedico este trabalho aos meu pais, por me darem a oportunidade de chegar até aqui.

Ao meu marido e à nossa filha Elis por me darem forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dr^a Mônica Hitomi Okura pelos ensinamentos, paciência e pela confiança depositada em meu trabalho. Às colegas de laboratório Wanessa dos Santos, Maria Clara e Letícia pelo companheirismo e ajuda e ao Wesley Botelho pelo apoio e colaboração. À Luciana Martins, pelo empenho e prestatividade durante todo o Programa de Pós-graduação. Aos professores e coordenadores do PPGCTA pela luta e conhecimento repassado.

Aos meus pais pelo exemplo de força, empenho e pelos ensinamentos mais belos da vida: amor, honestidade, respeito, caráter e fé.

Às minhas queridas irmãs pela união em todos os momentos. Ao meu marido Dalton e à nossa pequena Elis pelo amor e por renovarem as minhas forças nos momentos mais difíceis.

À toda a minha família, em especial tios e tias e aos meus amigos por estarem sempre por perto.

A Deus pela vida!

Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King Jr.

RESUMO

O aumento indiscriminado da utilização de pesticidas no campo vem trazendo sérias implicações para a saúde do homem e do meio ambiente. Com o intuito de que os pesticidas fossem letais apenas para as pragas alvo, surgiu a idéia do controle biológico, que propõe eliminar as pragas a partir de patógenos específicos, predadores ou parasitóides, evitando causar danos ao ser humano e seu ambiente. Os *Baculovirus*, vírus que causam patogenicidade para insetos específicos, vem sendo utilizado como controle biológico. No entanto, a sua produção laboratorial enfrenta dificuldades, sendo uma delas a contaminação das lagartas utilizadas (*S. frugiperda*-principal peste da soja e milho) por micro-organismos indesejáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento das lagartas utilizadas para a produção do *Baculovirus* após a contaminação das mesmas por micro-organismos previamente identificados. Para isto, identificaram-se os micro-organismos presentes nas lagartas: *Staphylococcus aureus* (22,5%), *Staphylococcus sp.* (42,5%), *Klebsiella oxytoca* (2%), *Pseudomonas aeruginosa* (8%), *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp.* (52%) e Leveduras (72%). Posteriormente, estes micro-organismos foram inoculados individualmente em lagartas saudáveis as quais foram observadas por um período de 12 dias, em ambiente ideal (temperatura 25°C e umidade 70%). Concluiu-se que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* se demonstraram muito prejudiciais à lagarta, causando perda de peso e morte precoce. As lagartas contaminadas por fungos tiveram comportamentos semelhantes. O grupo de lagartas contaminado pelas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* até o 9º dia não apresentaram diferença significativa na taxa de ganho de peso quando comparadas ao grupo controle. Entre as lagartas do grupo controle não houve nenhuma morte.

Palavras chave: *Baculovirus*, Controle Biológico

ABSTRACT

The increase in the use of pesticides in the field has been bringing serious implications for the human health and the environment. In order for pesticides to be lethal only to target pests, the idea of biological control, which proposes eliminating pests from specific pathogens, avoiding causing harm to human beings and their environment, emerged. *Baculoviruses*, a virus that cause pathogenicity for specific insects, has been used as biological control. However, its laboratory production faces difficulties, one of which is the contamination of the caterpillars used (*S. frugiperda*- the main pest of soybean and maize) by undesirable microorganisms. The objective of this work was to evaluate the behavior of caterpillars used for the production of *Baculovirus* after contamination by previously identified microorganisms. For this, was identified the microorganisms present in the caterpillars: *Staphylococcus aureus* (22.5%), *Staphylococcus sp.* (42.5%), *Klebsiella oxytoca* (2%), *Pseudomonas aeruginosa* (8%), *A. flavus* and *Penicillium sp.* (52%) and yeasts (72%). Subsequently, these microorganisms were inoculated individually in healthy caterpillars, which were observed for a period of 12 days, in an ideal environment (temperature 25 ° C and Humidity 70%). It was concluded that the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella oxytoca* proved very harmful to the caterpillar, causing weight loss and early death. The caterpillars contaminated by fungi had similar behaviors. The caterpillars contaminated by the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus sp.* until the 9th day showed no difference in the weight gain rate when compared to the control group. Among the caterpillars of the control group there was no death.

Key Words: *Baculovirus*, biological control

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos cocos quanto a morfologia.....	22
Tabela 2	Composição da dieta artificial de Greene.....	32
Tabela 3	Monitoramento do desenvolvimento das lagartas após a contaminação com os micro-organismos isolados no trabalho.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do Nucleopoliedrovírus e granulovírus.....	19
Figura 2	Técnicas de Micro e Macro cultivo.....	28
Figura 3	Representação esquemática da divisão dos grupos inoculados no trabalho.....	30
Figura 4	Lagarta na folha de mamona.....	31
Figura 5	Bandejas com copinhos identificados.....	31
Figura 6	Micro-organismos isolados e identificados nas lagartas <i>S. frugiperda</i> ..	33
Figura 7	Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, Vírus, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Leveduras</i> , <i>St. aureus</i> e <i>St. sp.</i>	35
Figura 8	Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, Vírus, <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Leveduras</i> , <i>St. aureus</i> e <i>St. sp.</i>	36
Figura 9	Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, Vírus, <i>Penicillium sp.</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Leveduras</i> , <i>St. aureus</i> e <i>St. sp.</i>	37
Figura 10	Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, <i>St. aureus</i> e <i>St. sp.</i>	38
Figura 11	Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, <i>St. aureus</i> e <i>St. sp.</i>	39
Figura 12	Avaliação da ingestão de dieta pelos grupos contaminados	40
Figura 13	Processo de transformação em pupa do grupo contaminado por <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus sp.</i>	41
Figura 14	Coloração das lagartas.....	42

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
ANVISA	Associação Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain Heart Infusion
<i>B. Spodoptera</i>	<i>Baculovirus spodoptera</i>
BV	Budded virions
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
g	gramas
GV	Granulovirus
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ml	Mililitros
NPV	Nucleopoliedrovirus
PDA	Potato Dextrose Agar
PDV	Polyhedra Derived Virus
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de polivinila
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SIM	Sulfato, Indol, Motilidade
SNCR	Sistema Nacional de Crédito Rural
TSI	Meio Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidade formadora de Colônia
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.1 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Utilização de agrotóxicos no Brasil e no mundo	13
3.2 Controle Biológico	15
3.3 Perspectivas do Controle Biológico no Brasil	18
3.4 <i>Baculovirus</i>	18
3.4.1 Característica do vírus	18
3.4.2 Produção do <i>Baculovirus</i>	19
3.5 <i>Spodoptera frugiperda</i>	20
3.6 Micro-organismos	21
3.6.1 Bactérias	21
3.6.1.1 <i>Staphylococcus sp.</i>	22
3.6.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.6.1.3 <i>Klebsiella oxytoca</i>	23
3.6.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.6.2 Fungos	25
3.6.2.1 <i>Penicillium sp.</i>	25
3.6.2.2 <i>Aspergillus flavus</i>	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Isolamento dos Micro-organismos contaminantes	27
4.1.1 Identificação dos fungos filamentosos	27
4.1.2 Identificação das bactérias	28
4.2 Inoculação dos Micro-organismos nas lagartas	30
4.3 Monitoramento do desempenho das lagartas	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Identificação dos micro-organismos	32
5.2 Monitoramento do desempenho das lagartas	34
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Spodoptera* são amplamente distribuídas no mundo e entre as 30 espécies descritas, metade é considerada praga de variadas culturas de grande importância econômica. Dentre elas, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) destaca-se por se alimentar de mais de 80 espécies de plantas, incluindo o algodoeiro, milho e soja, e pode causar perdas de até 73% da produção agrícola (POGUE 2002). Até 2007, esta praga foi controlada com a aplicação de inseticidas químicos. Posteriormente, introduziu-se as plantas transgênicas, permitindo a obtenção de genótipos com maior produtividade, qualidade e resistência à insetos (SARTORETO et al, 2018). Porém, alguns fatores como o clima tropical, produção maciça sem intervalos ou invernos rigorosos provocaram a infestação de lagartas justamente nas plantas transgênicas.

Nos últimos anos, o Brasil vem liderando o setor do agronegócio no mundo. Objetivando a produção em larga escala para suprir a demanda mundial e obter sucesso econômico, passou a ser também o maior consumidor de agrotóxicos (FAO, 2015). A utilização indiscriminada de agrotóxicos vem trazendo sérios danos ao meio ambiente e aos seres vivos, demonstrando uma incompatibilidade entre o controle econômico e ecológico.

Com o intuito de contribuir no combate às lagartas *S. frugiperda*, introduziu-se o controle biológico, que tem como objetivo principal controlar as pragas agrícolas e insetos a partir do uso de seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitóides ou micro-organismos, como fungos, vírus ou bactérias.

Os baculovírus são uma opção para controle biológico de lagartas no milho e pertencem a um grupo de vírus que possui patogenicidade aos insetos (ALMEIDA, 2010). *Baculovirus* são da família Baculoviridae, possuem DNA de fita simples dupla circular, tem grande potencial de afetar artrópodes. Possuem os gêneros nucleopoliedrovírus (NPV) e granulovírus (GV) os quais atuam nas células epiteliais do intestino médio dos insetos (KING & POSSEE, 1992). Dentre os tipos de isolados, I-18, I-19 e I-6NR, o isolado 6-NR é o único que não causa a liquefação do tegumento do inseto imediatamente após a sua morte o que facilita a coleta de lagartas mortas e a produção de inseticidas biológicos em grande escala (VALICENTE & TUELHER, 2009).

O surgimento de uma formulação comercial de *Baculovirus Spodoptera* é visto pelos agricultores como uma importante alternativa de combate a pragas, que pode ser

aliada a outras táticas de controle. Porém, para que se torne possível, algumas características do *Baculovirus spodoptera* como, por exemplo, a pureza do inóculo viral produzido, são essenciais para o desenvolvimento satisfatório em escala industrial. Neste trabalho, será avaliado o desempenho das lagartas *Spodopera frugiperda* quando contaminadas por outros micro-organismos, o que ainda é um dos problemas que reduzem e dificultam a produção industrial, elevando os custos e diminuindo a qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de lagartas *S. frugiperda* contaminadas por bactérias e leveduras.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolamento e identificação de micro-organismos das lagartas *S. frugiperda* doadas por uma empresa;
- Identificar o desempenho (ganho de peso, variação de crescimento, taxa de sobrevivência, pupação) das lagartas *S. frugiperda* após contaminação pelos micro-organismos identificados (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *A. flavus*, *Penicillium sp.* e Leveduras).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Utilização de Agrotóxicos no Brasil e no mundo

Após a segunda guerra mundial, com a revolução verde, que tinha o intuito de modernizar a agricultura e aumentar a produtividade, houve uma grande transformação no campo, como a introdução de novas tecnologias, máquinas, melhoramento genético e agroquímico. No Brasil, os agrotóxicos e fertilizantes químicos ganharam terreno no agronegócio na década de 1970, após a implantação do Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR). De acordo com este sistema, o montante dos empréstimos concedidos dependia da porcentagem de dinheiro a ser gasto em pesticidas. Dessa forma, as vendas de pesticidas aumentaram 945,51% entre 1998 e 2008 (VERÍSSIMO et al., 2016)

Enquanto o Brasil comemora ser líder mundial no setor do agronegócio, o mesmo também lidera uma crescente dependência de agrotóxicos. Segundo a ANVISA (2018) é responsável por 1/5 do consumo mundial de agrotóxicos, usando 19% dos agrotóxicos produzidos no mundo. Ainda conforme os dados da FAO (2015), o país aparece no ranking mundial em primeiro lugar em gastos com agrotóxicos e em sétimo quando analisada a quantidade de agrotóxico utilizada por área.

Nos últimos 40 anos o Brasil aumentou seu consumo de agrotóxicos em 700%, enquanto a área agrícola aumentou 78% no mesmo período (EMBRAPA, 2019)

O IBGE avaliou entre 2002 e 2012 um aumento de 155% na utilização de agrotóxicos no Brasil, tendo saltado de três quilos por hectare para sete quilos por hectare. O IBGE classificou ainda que 30% dos agrotóxicos utilizados no Brasil são classificados como muito perigosos.

O termo agrotóxico foi definido pela Lei Federal nº 7.802, Decreto nº 4.074, de 2002, como: “Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; São também, considerados pela supracitada lei, substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”. Esta lei foi criada com o intuito de controlar, classificar e fiscalizar a utilização, o transporte, a rotulagem, o armazenamento e a destinação final dos agrotóxicos. (BRASIL, 1989)

A introdução de agrotóxicos e pesticidas no campo inclui muitos benefícios como aumento da produção dos alimentos decorrente da diminuição da perda nas colheitas e conseqüentemente um aumento considerável do potencial econômico. Porém, essa introdução desenfreada traz sérias implicações para a saúde do homem e seu ambiente.

Entre os problemas causados pelo uso intensivo de agrotóxicos, incluem: a contaminação dos alimentos, do solo, da água, dos animais, a intoxicação de agricultores, a resistência de pragas a princípios ativos, a intensificação do surgimento de novas doenças; o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (EMBRAPA, 2019).

Segundo Benevides e Marinho (2015), o homem, os animais e o meio ambiente se encontram em uma perigosa rota de contaminação por agrotóxicos, já que os mesmos têm grande potencial acumulador devido às suas características de solubilidade, adsorção, deslocamento, persistência e toxicidade. Segundo Sengupta et al. (2009), idealmente, os agrotóxicos e pesticidas deveriam ser letais para as pragas alvo, mas não para as espécies não alvo como o homem.

Os prejuízos ao homem e ao meio ambiente têm trazido grande preocupação a diversos segmentos da sociedade e têm levado a uma demanda crescente por novas alternativas. O controle biológico, inserido no manejo integrado de pragas, é uma das opções viáveis para atender aos anseios da sociedade na busca constante por soluções sustentáveis.

3.2 Controle Biológico

O controle biológico foi definido por DeBach (1968) como “a ação de parasitóides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências”.

A idéia básica do controle biológico é controlar as pragas agrícolas e insetos que transmitem doenças a partir do uso de seus inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitóides ou micro-organismos, como fungos, vírus ou bactérias. O principal objetivo de se aplicar o controle biológico é controlar as pragas sadia, sem que se deixem resíduos que prejudiquem os alimentos, o meio ambiente e a saúde do homem (EMBRAPA, 2019). A Embrapa pesquisa sobre o controle biológico desde a década de 80, visando a sustentabilidade dos ecossistemas através da melhoria da qualidade dos produtos agrícola, a redução da poluição ambiental e preservação dos recursos naturais. Em um dos trabalhos pioneiros, iniciado em 1984, foi feito um levantamento dos principais inimigos naturais deste praga em diversas regiões produtoras de milho do estado de Minas Gerais, incluindo o Sul de Minas, Vale do Rio Doce e Alto Paranaíba. Durante o levantamento, entre 1984 e 1989, foram coletadas mais de 14.000 lagartas, onde foram encontrados diversos parasitóides das base ordens Diptera e Hymenoptera, incluindo várias lagartas mortas por vírus (VALICENTE, 1989). Este levantamento se estendeu até o estado do Paraná, onde foi detectado um alto índice de lagartas parasitadas e mortas por vírus (VALICENTE; BARRETO, 1999).

O *B. spodoptera* se mostrou eficiente no controle da lagarta do cartucho em

experimentos de campo, utilizando água de irrigação com aspersor setorial (VALICENTE; COSTA, 1995). Valicente et. al avaliaram a mortalidade da *S. frugiperda* por baculovírus em diferentes lâminas de água e obteve alta mortalidade larval independente da lâmina de água aplicada. Este fato também é importante no manejo da irrigação, permitindo economia de água a ser utilizada. Neste mesmo estudo avaliou-se que a mortalidade da *S. frugiperda* foi proporcional à dose aplicada.

O Controle Biológico pode ser feito com inimigos naturais de insetos-pragas abrangendo 3 categorias:

- **Agentes predadores:** Introdução de seres vivos de vida livre que matam e se alimentam dos insetos-pragas. Um predador é aquele que tanto na fase imatura quanto na fase adulta, alimenta-se de sua presa, precisando consumir certa quantidade de presas para que chegue à sua fase adulta. Ex: Adultos da joaninha *Hippodamia convergens*, por exemplo, consomem de 42 a 56 pulgões/dia, sendo que o total consumido por uma joaninha, durante toda a sua vida, pode chegar a 1000 pulgões (BUENO & BERTI FILHO, 1991).
- **Agentes parasitóides:** Introdução de seres vivos que parasitam outros seres impossibilitando-os de chegar à fase reprodutiva. O parasita pode se desenvolver interna ou externamente no hospedeiro (praga), matando-o no final do ciclo. Esses organismos vivem à custa de seus hospedeiros. São caracterizados como aqueles indivíduos que somente na sua fase imatura alimenta-se de seu hospedeiro, sendo necessário apenas um indivíduo-hospedeiro para completar seu desenvolvimento até a fase de adulto. O adulto é de vida livre, podendo se alimentar de néctar, pólen, secreções de cochonilhas e pulgões, substâncias açucaradas que exsudam de feridas dos vegetais ou de frutos perfurados por outros insetos, pássaros, etc. A relação parasitóide-hospedeiro apresenta-se mais adequada para uso em programas de controle biológico uma vez que, em geral, os parasitóides são mais específicos e apresentam grande capacidade de procura e encontro de seus hospedeiros (EMBRAPA, 2003).
- **Agentes Patógenos:** Introdução de micro-organismos, que podem se multiplicar nos organismos do seu hospedeiro causando-lhes infecções e outras complicações até a morte. Constituem-se de micro-organismos causadores de doenças em insetos e pertencem principalmente aos seguintes grupos: fungos, bactérias, vírus e nematóides. A utilização de inseticidas microbianos teve considerável crescimento nos últimos 20 anos, em função da alta especificidade e facilidade de multiplicação, armazenamento e comercialização, quando comparado com os predadores e parasitóides (ALVES, 1998).

Basicamente, existem três estratégias pelas quais os inimigos naturais podem ser

manejados pelo homem para que causem redução no nível populacional de uma praga, objetivando mantê-la abaixo do nível de dano econômico:

- **Controle Biológico Clássico:** refere-se à exploração, introdução, criação, liberação, estabelecimento e colonização de inimigos naturais, com o objetivo de reduzir o nível populacional de um determinado organismo indesejável (SÁ, 2016). Envolve a importação de agentes de controle biológico da região de origem da praga, seja de um país para outro, ou de uma região para outra, de modo a estabelecê-los permanentemente como novos elementos da fauna local. No entanto, esta estratégia ou modalidade de controle biológico envolve riscos, uma vez que se está introduzindo uma espécie exótica que poderá competir com a fauna nativa, podendo resultar em deslocamento de determinadas espécies nativas para outros habitats ou mesmo sua extinção (KAKEHASHI et al., 1984; HOWARTH, 1991; BENNETT, 1993; SAMWAYS, 1997). Para este tipo de controle biológico, vários estudos devem ser previamente realizados.
- **Controle Biológico Aumentativo ou por Incrementação (Aplicado):** Nessa estratégia, o inimigo natural é multiplicado massalmente no laboratório, portanto envolve a criação ou produção massal do inimigo natural com dieta artificial ou sobre hospedeiros (praga-alvo ou alternativos). Posteriormente, eles são liberados no campo no momento apropriado. Esse momento é decidido baseando-se na biologia da praga alvo, de modo a sincronizar as liberações quando a praga encontra-se em seu estágio mais susceptível, seja no desenvolvimento ou no tamanho da população (EMBRAPA, 2003).
- **Controle Biológico por Conservação (Natural):** Envolve a manutenção dos inimigos naturais nos agroecossistemas por favorecer ou fornecer condições de sobrevivência e reprodução e, conseqüentemente, aumentando sua efetividade. Nesse sentido, essa estratégia envolve, portanto, o manejo do habitat, também denominado de “manipulação ambiental”, a qual compreende qualquer prática agrônômica que vise o aumento e preservação de inimigos naturais nos agroecossistemas. É a tática de se aplicar o princípio da diversidade do habitat (DeLOACH, 1970).

3.3 Perspectivas do Controle biológico no Brasil

Algumas ações de demanda pelo uso sustentável de agrotóxicos no Brasil estão ocorrendo no legislativo, mesmo que de forma lenta. Um dos exemplos disso é o Projeto de lei do Senado nº 679 de 2011 (Art. 21^a), que criou a Política Nacional de Apoio ao

Agrotóxico Natural, e o decreto nº 7794, de 20/08/2012, que instituiu a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (EMBRAPA, 2019).

Em 2010, no Brasil, o mercado de produtos de controle biológico foi aproximadamente R\$ 70 milhões, tratando-se de aproximadamente 8 milhões de hectares/ano. Apesar os termos absolutos parecerem elevados, o percentual ainda é tímido, equivalente a 2% da venda do mercado de agrotóxicos sintéticos (EMBRAPA, 2019)

O perfil atual da indústria de agentes de controle biológico inclui pequenas e médias empresas especializadas. Apesar de o mercado estar ligado majoritariamente a pequenas e médias empresas, algumas grandes empresas tradicionalmente líderes no mercado de agrotóxicos sintéticos estão reativando a utilização de biopesticidas com o intuito de melhorar os negócios no mercado brasileiro. As perspectivas é que o mercado de biopesticidas duplique ou triplique mundialmente nos próximos 10 anos e conseqüentemente a demanda pelo aperfeiçoamento das pesquisas neste ramo também aumente (EMBRAPA, 2019).

3.4 *Baculovirus*

3.4.1. Característica do vírus

Os *Baculovirus* compreendem o maior grupo de vírus patogênicos a insetos, encontrados principalmente na ordem Lepidoptera. É taxonomicamente dividido em dois gêneros, os Nucleopolyhedrovirus (NPV) e os Granulovirus (GV), os quais se diferem pela morfologia do corpo de oclusão. O NPV produz grandes estruturas chamadas poliedros, que contêm muitos viriões, enquanto o GV tem órgãos de oclusão menores chamados grânulos, que normalmente contêm apenas um virião. Durante o ciclo de vida são produzidos dois tipos de progênes virais: BV (Budded Virus) e PDV (Polyhedra Derived Virus), que são essenciais para o processo de infecção e propagação do vírus.

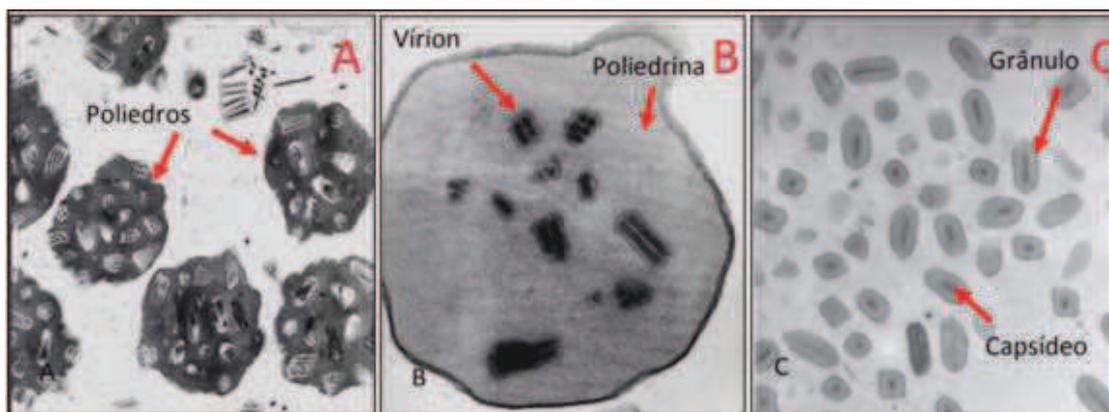


Figura 1: (A) e (B): infecção por um isolado de nucleopoliedrovírus (MVPN), podendo-se observar os poliedros, os vírions e a matriz protéica de poliedrina. Notar que vários nucleocapsídeos estão envoltos por uma membrana comum; (C): granulovírus (GV), onde se é observado apenas um capsídeo por envelope protéico.

Fonte: VALICENTE & TUELHER, 2009 (Fotos: E.W. Kitajima).

Embora esses vírions, BV e PDV, sejam considerados genotipicamente idênticos, eles desempenham papéis distintos no ciclo infectivo do vírus. Diferem quanto à morfologia e composição protéica, origem dos envelopes virais, modo de penetração na célula hospedeira infectividade (PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA, 1999). A forma ocluída do vírus, PDV é responsável pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a forma não ocluída (BV) é responsável infecção sistêmica, ou seja, pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (VALICENTE & TUELHER, 2009).

A oclusão das partículas virais em matriz protéica é uma característica extremamente importante, pois é o que garante proteção e possibilita a transmissão horizontal do vírus, ou seja, de um inseto para outro (BLISSARD; ROHRMANN, 1990). As oclusões virais, portanto, são estruturas de resistência permitindo que os vírus mantenham a infectividade mesmo fora do hospedeiro. (HUNTER-FUJITA et al., 1998) 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 (VALICENTE, 2010).

3.4.2. Produção do *Baculovirus*

No processo de produção do *Baculovirus*, a lagarta *S. frugiperda* se alimenta da

folha de milho contaminada por baculovírus, e, infecta-se através da penetração dos corpos virais no seu sistema digestivo. A matriz proteica de proteção do vírus é rompida pelo pH alcalino (aproximadamente 11) do intestino da lagarta, e, em sequência são liberados os vírions no lúmen digestivo da lagarta. Durante o processo de infecção o inseto fica debilitado, perde a sua capacidade motora e de alimentação, morrendo em aproximadamente entre 5 a 8 dias e com corpo descolorido em relação às lagartas sadias. Dois dias após a morte da lagarta, o corpo do inseto se rompe, liberando grande quantidade de vírus (MOSCARDI & SOUZA, 2002).

Este material é purificado e a atividade biológica do mesmo é verificada para avaliar a eficiência do inóculo viral produzido para que o mesmo possa ser utilizado como controle biológico de pragas. No entanto, este processo não é tão simples. Apesar do avanço nas pesquisas relacionadas ao *Baculovirus* nos últimos anos, a multiplicação do mesmo em laboratório ainda enfrenta dificuldades.

Segundo Sousa (2015), conhecer o ambiente favorável ao desenvolvimento da espécie *S. frugiperda* é essencial para otimizar a produção do vírus. Entre os fatores que influenciam a produção do vírus em laboratório, estão: as condições ambientais no momento de produção (temperatura, pH, umidade, fluxos de ar, fotoperíodo, pressão); a biologia do hospedeiro (idade, sexo e estágios de desenvolvimento), a concentração e atividade do vírus e a purificação do inóculo viral (descontaminação por fungos, bactérias e outros vírus).

Os baculovírus têm sido estudados como agentes de controle biológico desde a década de 60 (PAYNE, 1986). São ótimos candidatos pela sua especificidade e por serem inofensivos a outros seres vivos e ao meio ambiente.

3.5 *Spodoptera frugiperda*

Uma das pragas que causam maiores danos econômicos na agricultura são espécies do gênero *Spodoptera*. O gênero se adapta principalmente a regiões tropicais e subtropicais e está amplamente distribuído pelo mundo. Entre as 30 espécies descritas do gênero *Spodoptera*, metade é considerada praga de variadas culturas de importância econômica (POGUE, 2002).

Dentre elas, *S. frugiperda* (J.E. Smith) destaca-se por se alimentar de mais de 80 espécies de plantas, incluindo o algodoeiro, milho e soja (POGUE 2002, CAPINERA 2008).

A *S. frugiperda* é um inseto com metamorfose completa, isto é, durante seu ciclo de vida passa por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto. Em seu estágio larval, é uma das mais importantes pragas da cultura do milho no Brasil e se destacam por serem polifásicas, ou seja, alimentam-se de todas as fases da cultura (CRUZ, 1995).

No Brasil, um dos fatores que pode estar contribuindo para a dificuldade do manejo da lagarta é a grande oferta de hospedeiros ao longo do ano devido à sucessão de culturas, que pode favorecer o movimento de *S. frugiperda* entre os cultivos (NAGOSHI 2007).

Como as principais culturas atacadas pela *S. frugiperda* (milho, algodão e soja) são importantes sistemas de produção agrícola no Brasil, torna-se importante estudar seu manejo, principalmente meios naturais de combatê-las.

3.6 Micro-organismos

3.6.1 Bactérias

Segundo MOLINARO et al, 2013, as bactérias possuem tamanho da ordem de milésimos de milímetros e podem ser observadas em microscópico óptico. Elas podem se apresentar em três tipos morfológicos fundamentais:

- Bastonetes ou bacilos: Bastonetes longos ou curtos com extremidade reta ou de ponta arredondada, ou ainda curvos, em forma de vírgula. A maioria se apresenta de forma isolada, ocasionalmente ocorrem aos pares (diplobacilos) ou cadeias (estreptobacilos).
- Espirilos: Forma de hélice, sacarroilha, ou espiral. Ocorrem predominantemente em formas isoladas, apresentando nítidas diferenças de comprimento, largura e número.
- Cocos: Podem ser esféricos, elípticos, em forma de ponta de lança ou riniformes. Os cocos formar diferentes arranjos, de acordo com a sua divisão celular e planos.

Tabela 01: Classificação dos cocos quanto a morfologia

Arranjo	Agrupamento	Planos
Diplococos	Grupos de 2 cocos	1
Estreptococos	Cadeia	1
Tétrades	Grupos de 4 cocos	2
Sarcinas	Grupos de 8 cocos	3
Estafilococos	Grupos aleatórios	Muitos (cachos de uva)

Fonte: (MOLINARO et al, 2013)

Os grupos de bactérias podem, resumidamente ser divididos de acordo com a sua morfologia e coloração da parede celular (MOLINARO et al, 2013). Seguem abaixo alguns exemplos para cada grupo:

- Cocos Gram-positivos: Se dividem em *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*.
- Cocos Gram-negativos: *Neisseria*
- Bastonetes Gram-positivos: *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Listeria*
- Bastonetes Gram-negativos: Entéricos (*Aeromonas*, *Pseudomonas*); ou não entéricos (*Brucella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Helicobacter*, *Haemophilus*)
- Espiroquetídios: Bactérias que ocorrem isoladas e possuem morfologia espiral que de um modo geral não se coram bem pela técnica de Gram (*Leptospira*, *Treponema*, *Borrelia*)

3.6.1.1 *Staphylococcus* sp.

São cocos gram-positivos, esféricos, imóveis, possuem aproximadamente 1 μ de diâmetro e são encontrados predominantemente sob a forma de cachos irregulares. Alguns representantes destes microrganismos compõem a flora normal da pele e das mucosas do homem, enquanto outros são responsáveis por vários tipos de infecções, podendo levar a septicemias fatais. O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui, atualmente, mais de 30 espécies, sendo que três delas aparecem com frequência como agentes importantes em bacteriologia médica (*S.aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*). Alguns exemplares destas bactérias podem desenvolver resistência a antimicrobianos, sendo responsáveis por grande parcela de

multirresistência em infecções hospitalares e criando problemas terapêuticos de difícil solução. Os estafilococos podem ser cultivados em grande parte dos meios de cultura, em condições de aerobiose. A temperatura ideal para o seu crescimento é de 37°C. As colônias em meio sólido são esféricas e brilhantes, podendo haver formação de várias tonalidades de pigmentos (MOLINARO et al, 2013).

3.6.1.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus*, é a espécie considerada como mais patogênica do gênero *Staphylococcus*. É geralmente hemolítica, podendo produzir um pigmento amarelo. Caracteriza-se pela produção da enzima coagulase e fermentação do manitol. Por produzir várias enzimas e toxinas extracelulares é responsável por causar várias doenças, desde intoxicações de fundo alimentar a síndromes gravíssimas, como a do choque tóxico. A característica da lesão causada por esta bactéria é o aparecimento de abscessos localizados e de supurações focais. A partir do foco, o microrganismo pode se disseminar por via linfática e sanguínea para outras partes do corpo. Doenças como osteomielite, pneumonia, meningite e endocardite, podem estar associadas à este microrganismo (MOLINARO et al, 2013).

3.6.1.3 *Klebsiella oxytoca*

O gênero *Klebsiella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, que é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram negativas que são comumente isoladas de amostras biológicas e encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo ser isoladas da água, solo, plantas e do trato gastrointestinal de seres humanos e animais (KONEMAM et al. 2001, ABBOTT 2007).

As Enterobactérias apresentam-se amplamente distribuídas na natureza, sendo um dos principais agentes Gram-negativos causadores de infecção hospitalar, especialmente infecção de corrente sanguínea (DIEKEMA et al. 2007; WISPLINGHOFF et al. 2004). As espécies de *Klebsiella* têm emergido como patógenos oportunistas, capazes de desenvolver também quadros de infecções adquiridas na comunidade (KO et al. 2002). Entretanto, a maioria das infecções causadas por estes microrganismos continua sendo de origem hospitalar, cenário em que emergem rapidamente como uma das principais bactérias Gram-negativas causadoras de infecção do trato urinário, pneumonia, infecções

intra-abdominais e de corrente sanguínea, em pacientes imunocomprometidos e/ou com sérias doenças de base.

As espécies do gênero *Klebsiella* também podem ser encontradas nos alimentos e nas fezes humanas e de outros animais (ABBOTT 2007).

Entre as espécies de *Klebsiella* descritas como sendo capazes de causar doença em humanos, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são as espécies mais frequentemente isoladas e são, portanto, consideradas patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecção do trato urinário e de tecidos moles (FRIEDLAND et al. 2003; LOCKHART et al. 2007). A maioria das espécies de *Klebsiella* pode ser identificada e diferenciada por testes laboratoriais convencionais baseados, principalmente, no perfil bioquímico das amostras.

3.6.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas* pertencem filo Proteobacteria, à família Pseudomonadaceae, que compreende várias espécies, sendo que aproximadamente 25 destas possui alguma implicação humana. O grupo se divide em diferentes gêneros, sendo que o gênero *Pseudomonas* tornou-se bastante conhecido, através do isolamento hospitalar constante de uma de suas espécies. *Pseudomonas aeruginosa* é encontrada em pelo menos 70% dos casos de infecção por *Pseudomonas*. É um patógeno tipicamente oportunista, podendo causar várias doenças, principalmente em imunodeprimidos. Sua patogenia engloba desde infecções localizadas (processos cirúrgicos ou queimados) até septicemias severas. Atualmente, é considerado um patógeno alerta em infecções nosocomiais, devido a sua característica de manutenção em locais úmidos e elevada resistência a muitos antibióticos e antisépticos, sendo possível sua transmissão nestes ambientes hospitalares, por desinfetantes, respiradores, cateteres, alimentos, etc. Podendo ser isolada facilmente pela cultura, a diferenciação pode ser feita com base em provas bioquímicas ou pela capacidade de algumas cepas produzirem um pigmento azul-esverdeado chamado piocianina (MOLINARO et al, 2013).

3.6.2 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e α -glucano. Não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfológicamente semelhantes a estas (MOLINARO et al, 2013).

O reino Fungi é dividido em sete filós, (*Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*), e um grupo, os fungos anamórficos. Este grupo não possui valor taxonômico, sendo seus membros relacionados aos filós *Ascomycota* e *Basidiomycota* por comparação de sequências gênicas (MOLINARO et al, 2013).

Os Fungos do grupo Anamórficos formam um grupo de fungos onde a reprodução assexuada é predominante, com a formação de conídios como estrutura de propagação.

A reprodução sexuada é ausente, desconhecida ou teve a capacidade perdida. São considerados como cosmopolitas, saprófitos, e parasitas de animais e plantas. Os conídios são prolongamentos de hifas modificadas, com função reprodutiva. Eles podem ter conídios diferentes formas, tamanhos e cores, podem possuir ou não a superfície texturizada, ornamento ou septo. Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos. Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada micélio, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos (MOLINARO et al, 2013).

Os fungos *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, identificados neste trabalho, são exemplos de fungos deste grupo.

3.6.2.1 *Penicillium sp.*

O gênero *Penicillium* foi classificado como pertencente ao Filo *Ascomycota*, classe *Eurotomycete*, ordem *Eurotyales* família *Trychocomanaceae*. O gênero *Penicillium* é considerado importante no que se refere à contaminação alimentar, são amplamente distribuídos no mundo todo e estão presentes em solo, ar, vegetação e em

deteriorização (PITT,2000).

Muitas pesquisas aplicadas vêm demonstrando que as espécies pertencentes a este gênero têm alto potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, micoparasitismo, utilização de seus metabólitos secundários são fontes de enzima de interesse industrial e novos fármacos para a indústria farmacêutica (PALLU, 2010). Porém, algumas espécies deste gênero também são produtoras de micotoxinas. A importância desses compostos tóxicos varia muito sendo regida pelos fatores micológicos e biológicos de cada espécie. O *Penicillium* também é relatado como patógeno oportunista de plantas, espécies desse gênero encontram-se amplamente distribuídas e apresentam impactos negativos e positivos (PITT, 2000).

Numerosas espécies do gênero *Penicillium* apresentam um valor particular. As mais conhecidas são o *Penicillium notatum*, produtor do antibiótico penicilina e na indústria alimentícia, o *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* utilizados na produção de queijos (CHAVEZ et al, 2006).

3.6.2.2 *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus* é um gênero de fungos anamórficos que se reproduzem pela produção de fialoconídios (KLICH, 2002). Possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Podem manter-se em desenvolvimento sob condições adversas, tais como baixa umidade e atividade de água. Possuem espécies encontradas como contaminantes em todos locais da Terra. Dominam especialmente em áreas mais quentes e são mais comuns nos trópicos (PITT e HOCKING, 1997). Tratando-se de morfologia, as colônias apresentam colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco. Em relação à importância econômica, o *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, muitos isolados são utilizados na produção de diversos produtos, porém, algumas espécies são também responsáveis por desordens em várias plantas, sendo considerados patógenos oportunistas. Entre os patógenos mais comuns desse gênero, encontra-se a espécie *A. flavus* (VARGA et al, 2004).

O fungo *A. flavus* pode causar aspergilose que é uma doença que se apresenta nos tecidos como hifas hialinas septadas e ramificadas dicotomicamente, ou seja, num ângulo de 45°. A micose se manifesta em três formas clínicas: a alérgica, de colonização e a forma invasiva. Poucos grupos de *Aspergillus* causam infecção no homem. Espécies de

Aspergillus dos grupos *fumigatus*, *niger* e *flavus* são os patógenos mais comuns. O aspecto microscópico do conidióforo permite a distinção entre as diferentes espécies (MOLINARO et al, 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento dos micro-organismos contaminantes

Para a realização do trabalho foram utilizadas lagartas mortas de *S. frugiperda* cedidas por uma indústria de controle biológico de Uberaba. Foram utilizadas 50 amostras de lagartas mortas, as quais foram maceradas em pistilo esterilizado. Após a maceração uma amostra de 1 g foi diluídas em 9 ml de salina a 0,1% (10^{-1}), realizando em seguida a diluição seriada de 10^{-2} e 10^{-3} .

Para avaliar o crescimento dos fungos filamentosos e leveduras, utilizou-se a técnica de *Spread Plate*, onde 0,1 ml das diluições foram inoculadas em placas contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) e foram incubados a 25°C por 5 dias. Para avaliar o crescimento de bactérias foi utilizada a técnica de *Pour Plate*, colocando-se 1 ml das diluições (10^{-1} a 10^{-3}) nas placas de Petri vertendo o meio ágar Brain Heart Infusion (BHI). As placas foram incubadas a 37°C por 48h e posteriormente foi realizada contagem do crescimento por UFC (nº/diluição) (SILVA et al, 2007).

4.1.1. Identificação de Fungos Filamentosos

Para a identificação dos fungos filamentosos utilizou-se a técnica de microcultivo e de macrocultivo (SILVA et al, 2007). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. As técnicas de microcultivo e macrocultivo estão representadas na Figura 1.

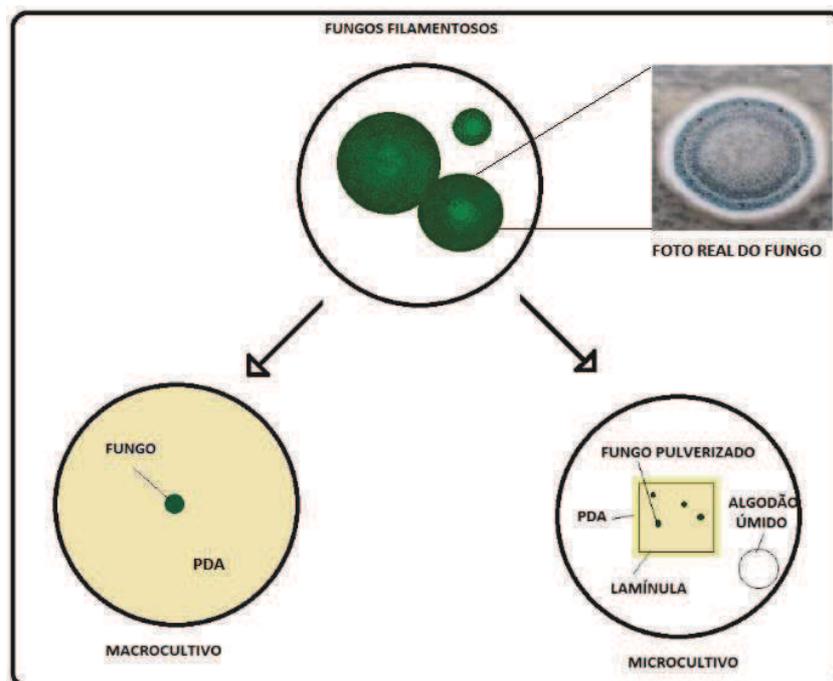


Figura 2. Técnicas de Microcultivo e Macrocultivo

Fonte: Próprio autor (2019)

4.1.2. Identificação de Bactérias

Após o crescimento em meio de cultura Agar BHI realizou-se a técnica de Coloração de Gram para a primeira identificação da bactéria.

Para as bactérias Gram positivas seguiu-se o teste catalase, segundo Winn et al, 2012, este teste é utilizado para diferenciar estafilococos de estreptococos pois detecta a presença da enzima citocromo oxidase. O teste é efetuado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em lâmina, e a produção imediata e vigorosa de bolhas indica a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Os estafilococos são catalase positiva, ou seja, o teste resulta em formação de bolhas e os estreptococos são catalase negativa.

Após realizar o teste de catalase, seguiu-se para o teste de coagulase. A coagulase estafilocócia é uma proteína de composição química desconhecida que converte fibrinogênio em fibrina insolúvel na presença de plasma e um coágulo visível se forma em consequência disso. O teste é considerado negativo se nenhuma aglutinação ocorrer após 2 minutos (WINN et al., 2012)

Para as bactérias Gram-negativas, foram empregados série bioquímica: Motilidade (SIM- Sulfato, Indol, Motilidade), Meio Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Ureia e Citrato (ANVISA, 2013).

No teste de motilidade foi utilizado o meio SIM. O objetivo deste teste foi determinar se o micro-organismo é ou não móvel, ou seja, se possui ou não flagelo. Flagelos ocorrem nos bacilos Gram-negativos. Poucas formas de cocos são móveis (ANVISA, 2013). O meio SIM foi preparado de acordo com as instruções da Anvisa e uma colônia pura foi inoculada lentamente no meio com alça esterilizada na posição vertical. Os micro-organismos móveis migram pela linha inoculada turvando o meio, enquanto os de motilidade negativa crescem apenas na linha inoculada e não turvam o meio.

O teste de Citrato determina se um micro-organismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono para o seu desenvolvimento. A utilização do citrato como fonte de energia gera uma grande quantidade de gás carbônico (CO_2). Este gás em excesso pode reagir com o sódio (Na^+) e a água (H_2O) do meio, produzindo compostos alcalinos como o carbonato de sódio (Na_2CO_3). Isto faz com que o pH do meio se torne alcalino, ocasionando a viragem do indicador para azul, que é considerado um resultado positivo (VERMELHO et al., 2006).

De acordo com a ANVISA, o teste TSI, tem por objetivo diferenciar bacilos Gram-negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás. Este meio contém três açúcares: glicose, lactose, sacarose além de vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo). A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo. Sendo assim, o teste permite verificar a fermentação da glicose, lactose e/ou sacarose por meio do aparecimento de coloração amarela no ápice e na base do tubo, fermentação apenas da glicose se ocorrer coloração púrpura no ápice e amarela na base e a produção de gás (CO_2), indicada pela formação de bolhas ou rachaduras no meio. Quando a lactose e/ou a sacarose não são fermentados, o ápice permanece com a cor original, âmbar (ANVISA, 2013).

O teste com Ágar base Uréia, tem por objetivo determinar a habilidade do micro-organismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio (ANVISA, 2013). Em um resultado negativo, a cor original do meio que é amarelo palha é mantida e em um resultado positivo o meio altera-se para a cor rosa pink.

4.2. Inoculação dos micro-organismos nas lagartas

Após isolamento e identificação das bactérias e dos fungos, esses micro-organismos foram inoculados individualmente em lagartas “saudáveis” (sem contaminação aparente) cedidas pela empresa, e posteriormente o desenvolvimento das lagartas contaminadas foi avaliado. Foram identificados sete micro-organismos, assim cada um deles foi inoculado em um grupo diferente, contendo cada um, 50 lagartas. Além desses grupos, foram também inoculado vírus *Baculovirus* em 50 lagartas consideradas controle positivo para vírus e em 50 lagartas sem contaminação com nenhum micro-organismo considerando-os grupo controle negativo, totalizando 450 lagartas

Para a inoculação das lagartas, folhas novas e orgânicas de mamona foram imergidas em solução de hipoclorito com água purificada na concentração de 2% por aproximadamente 20 minutos. Após este procedimento as folhas foram lavadas em quatro (4) recipientes com água purificada para retirar todo o excesso hipoclorito. Em seguida as folhas de mamona foram colocadas em peneiras limpas para retirar o excesso de umidade e cortadas uniformemente.

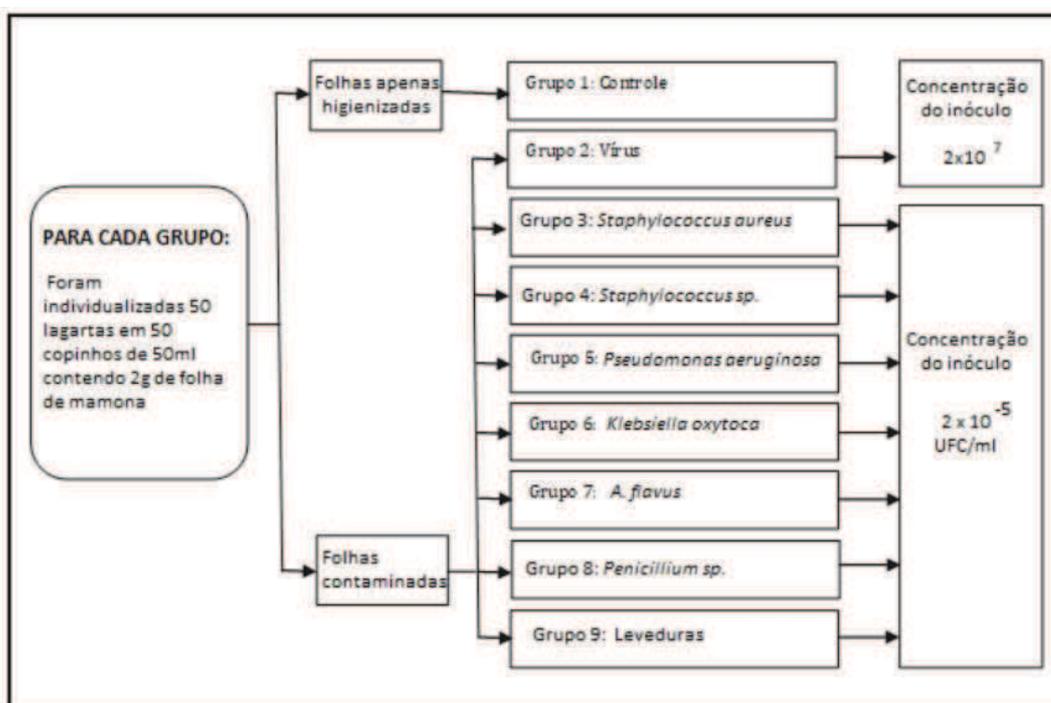


Figura 3. Representação esquemática da divisão dos grupos inoculados no trabalho.

4.3. Monitoramento do desempenho das lagartas

Os parâmetros observados nas lagartas no decorrer do experimento foram: a quantidade de alimento consumido por cada uma; a variação de peso (em g); a cor das mesmas e a taxa de sobrevivência específica de acordo com a classe etária.

Foram preparados os inóculos dos micro-organismos na concentração de 2×10^{-5} UFC/ml em caldo de Brain Heart Infusion (BHI). As folhas de mamona já higienizadas foram passadas individualmente nos inóculos e após retirada a umidade, foram colocadas em recipientes plásticos com capacidade de 50 ml com tampas de PVC, conforme Figuras 04 e 05.



Figura 04. Lagarta na folha de mamona



Figura 05: Bandejas com copinhos identificados

Para o grupo controle, em cada um dos 50 copinhos foram colocados 2g de folha de mamona higienizada e uma lagarta saudável previamente pesada e medida. Os copinhos foram tampados. O mesmo procedimento foi repetido, porém com folhas contaminadas com cada um dos micro-organismos identificados (*Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Aspergillus flavus, sp.*, Leveduras) e com o vírus. A partir do 3º dia, após terem se alimentado das folhas, as lagartas passaram a ser alimentadas por dieta artificial de Greene, considerada a mais adequada para a espécie (BUSATO et al, 2006).

Tabela 02: Composição da dieta artificial de Greene.

Constituinte	Quantidade
Feijão branco	102,90g
Germe-de-trigo	82,30g
Fareli de Soja	41,20g
Leite em pó	30,90g
Levedura de cerveja	51,40g
Ácido ascórbico	4,90g
Ácido sórbico	2,50g
Nipagin	4,10g
Solução vitamínica	8,20ml
Tetraciclina	0,10g
Formoldeído (40%)	4,90ml
Agar	18,90g
Água	1400,00ml

Fonte: Busato, (2006).

As lagartas foram monitoradas por 12 dias. Nos dias ímpares (1º, 3º, 5º, 7º, 9º 11º dias), as mesmas foram pesadas, de forma a verificar o quanto haviam engordado. A dieta das mesmas também foi pesada de forma a verificar a quantidade consumida por cada uma delas, e foram observadas as características físicas como cor e vida. Nesses dias, após pesadas, as dietas e os copinhos foram trocados.

Nos dias pares, foi realizada apenas a observação das lagartas (cor e vida). As cores observadas foram divididas em 3 parâmetros, sendo eles: marrom, pretas e rosadas/claras.

Durante todos os dias de experimento foram mantidas a umidade de 70% e temperatura de 25°C, consideradas ideais para o crescimento das lagartas *S. frugiperda* segundo Souza 2015.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação dos micro-organismos

Em 2% (1/50) das lagartas não foi observado crescimento de micro-organismos. Em 52% das lagartas cresceram fungos filamentosos, tendo sido identificados, em 96%

das mesmas o fungo *Penicillium sp.* e em 11% o fungo *A. flavus*. Houve crescimento de leveduras em 72%. Entre as bactérias, 22% foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, 42% *Staphylococcus sp.*, 8% *Pseudomonas aeruginosa* e 2,0% como *Klebsiella oxytoca*. Os resultados da identificação das bactérias e dos fungos encontram-se na Figura 6.

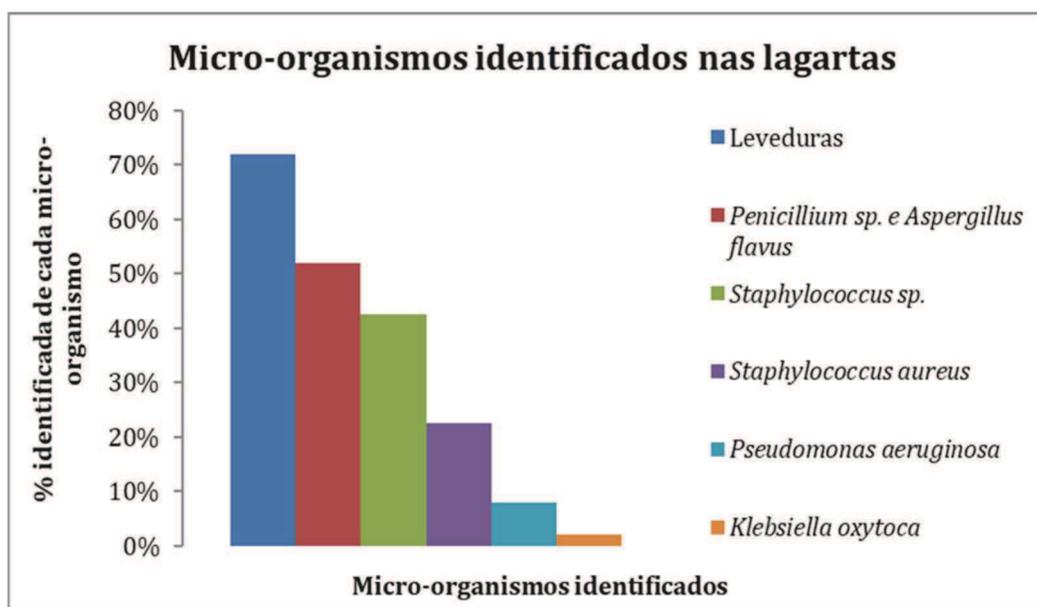


Figura 6: Micro-organismos isolados e identificados nas lagartas *S. frugiperda*.

Conforme pode-se observar foi identificada maior quantidade de fungos (leveduras e fungos filamentosos) que de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*). Entre as bactérias, foi identificada uma significativa quantidade pertencente ao gênero *Staphylococcus* e em menor quantidade foram identificados *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*.

Rolim, 2014, em uma análise da diversidade da microbiota intestinal de adultos de *S. frugiperda* indicou a existência de pelo menos seis filos de Bacteria, sendo Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, os mais comuns. A maioria das bactérias isoladas em meio de cultura de *S. frugiperda* pertencem ao filo Firmicutes sendo o gênero *Bacillus* o mais abundante (AUSIQUE, 2014). Lagartas coletadas em cartuchos de milho apresentaram abundância de filotipos *Klebsiella oxytoca* (COSTA, 2016).

Apesar de uma grande variedade de filotipos bacterianos terem sido caracterizados e associados a intestinos de lepidopteros, o papel que desempenham na fisiologia e adaptação das lagartas é pouco conhecido (PRYA et al, 2012, SHAO et al

2014).

5.2 Monitoramento do Desempenho das lagartas após a inoculação dos micro-organismos

a) Avaliação do ganho de peso das lagartas

Para as análises estatísticas dos resultados foi considerada a taxa de ganho de peso dos 9 grupos, sendo eles: grupo das lagartas saudáveis (controle) e os grupos das lagartas contaminadas com Vírus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *A. flavus*, *Penicillium sp.* e Leveduras. Primeiramente foi realizada uma análise exploratória dos dados e os outliers (dados discrepantes) foram excluídos considerando o não comprometimento do tamanho das amostras. Posteriormente foi realizada a comparação das médias das taxas de ganho de peso, tendo sido possível avaliar a diferença das médias de ganho de peso de cada grupo em relação ao controle.

Para as análises foi utilizado o teste ANOVA. A distribuição das taxas de ganho de peso da maioria dos grupos não se demonstrou normal, mas quando o tamanho da amostra é maior que 20, o Teste ANOVA fornece dados confiáveis. No presente estudo, após a eliminação dos dados discrepantes, o tamanho das amostras variou entre 45 e 50 para todos os grupos. Os testes estatísticos para comparar as médias de ganho de peso dos nove grupos foram realizados com graus de confiança de 95%, considerado distribuição não normal e variâncias desiguais. Para variâncias diferentes, assumiu-se o teste ANOVA de Welch. Para a análise simultânea de diferença de médias, foi utilizado o teste de Games Howell para variâncias diferentes e o teste de Tukey para variâncias iguais.

A avaliação de ganho de peso foi realizada nos dias ímpares do experimento.

No 3º dia, o resultado dos testes simultâneos de Games-Howell para as diferenças das médias das taxas de ganho de peso do primeiro para o terceiro dia apontou que: Estatisticamente, a média das taxas de ganho de peso dos grupos de lagartas contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* e *Penicillium sp.* foram significativamente diferentes das médias de ganho de peso do grupo controle. Este resultado pode ser observado na figura 07.

É ainda possível afirmar que a diferença da média da taxa de ganho de peso das lagartas contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* foi mais significativa que a

diferença da média da taxa de ganho de peso das lagartas contaminadas com *Klebsiella oxytoca* e o impacto sobre o grupo contaminado por *Penicillium sp.* foi ainda menor.

Os demais grupos de lagartas (contaminadas por Vírus, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *A. flavus*, e leveduras) não tiveram diferença na taxa de ganho de peso neste período.

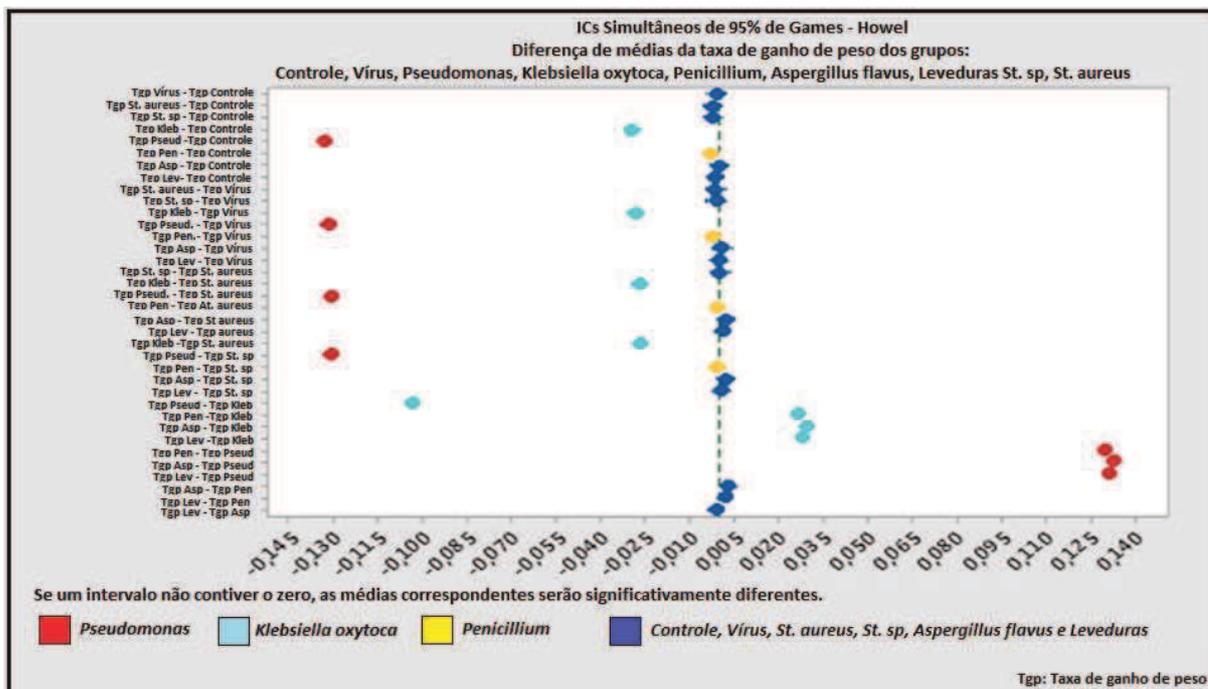


Figura 07: Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, Vírus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Penicillium sp.*, *A. flavus*, *Leveduras*, *S. aureus* e *Staphylococcus . sp*

No 5º dia, identificou-se que 90% das lagartas contaminadas com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, que já haviam apresentado perda de peso do primeiro para o terceiro dia, morreram. Sendo assim, não foi possível utilizar os dados de ganho de peso das lagartas contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* a partir do dia 5.

O resultado dos testes simultâneos de Games-Howel para as diferenças das médias das taxas de ganho de peso do 3º para o 5º dia, apontou que: Estatisticamente, a média das taxas de ganho de peso dos grupos de lagartas contaminadas com *Klebsiella oxytoca* e Vírus foram significativamente diferentes das médias do grupo controle. Este resultado pode ser observado na Figura 08.

Foi possível afirmar que a diferença de médias de ganho de peso do grupo contaminado pela bactéria *Klebsiella oxytoca* em relação ao grupo controle foi mais significativo que a diferença das médias de ganho de peso do grupo contaminado por

vírus. Os demais grupos não apresentaram diferença na média de ganho de peso do terceiro para o quinto dia em relação ao grupo controle.

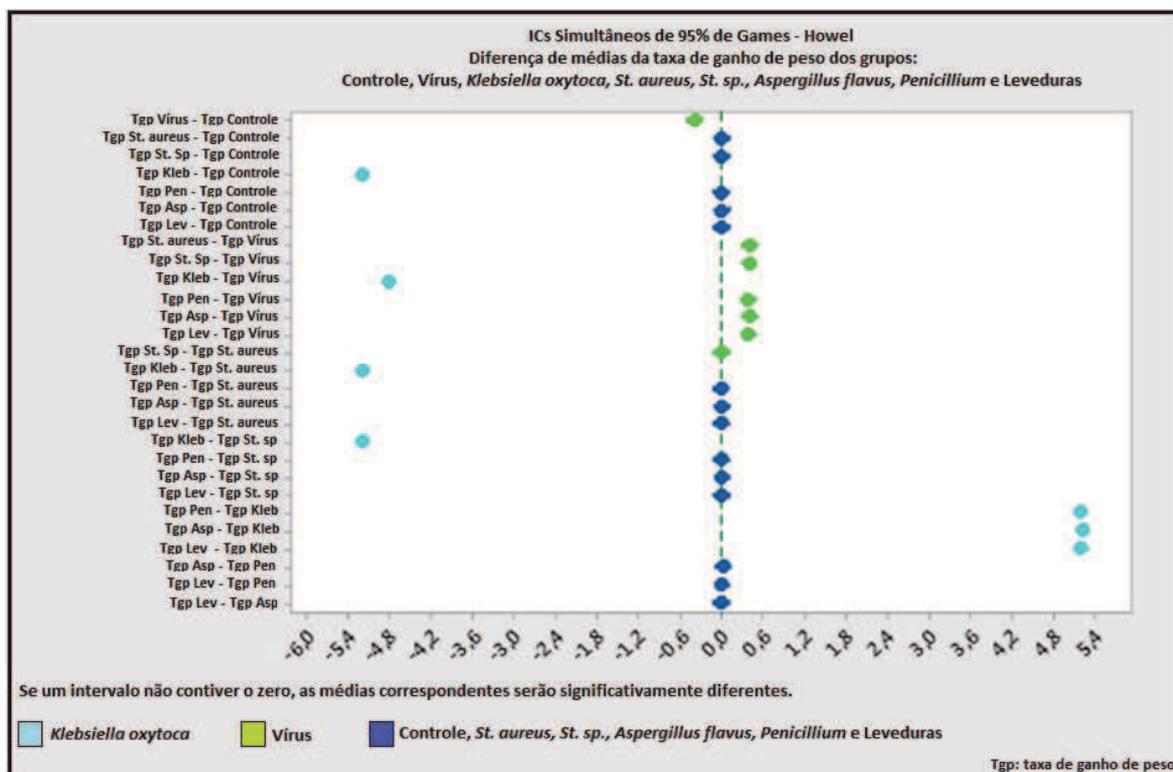


Figura 08: Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, Vírus, *Klebsiella oxytoca*, *Penicillium sp.*, *A. flavus*, *Leveduras S. aureus* e *Staphylococcus . sp*

No 7º dia, 95% as lagartas contaminadas com a bactéria *Klebsiella oxytoca* que já haviam apresentado significativa perda de peso do primeiro ao quinto dia, morreram. Sendo assim, não foi possível utilizar os dados de ganho de peso das lagartas contaminadas com *Klebsiella oxytoca* a partir do dia 7. Entre o 5º e o 7º dia, 10% das lagartas contaminadas vírus, haviam morrido, mas ainda restaram dados para continuar avaliando a taxa de ganho de peso de tais lagartas.

O resultado dos testes simultâneos de Tukey para as diferenças das médias das taxas de ganho de peso do 5º para o 7º dia apontou que: Estatisticamente, a média das taxas de ganho de peso dos grupos de lagartas contaminadas com Vírus e os grupos contaminados com os fungos *A. flavus*, *Penicillium sp.* e Leveduras foram significativamente diferentes das médias do grupo controle. As lagartas contaminadas

pelas bactérias *St. Aureus* e *St. Sp* não apresentaram diferença em relação ao grupo controle. Estes resultados encontram-se na Figura 09.

Os grupos contaminados por Vírus, *A. flavus* e *Penicillium sp.* ganharam menos peso que o grupo controle e os grupos contaminados pelas bactérias *St. Aureus* e *St.sp.* não apresentaram diferença de ganho de peso em relação ao grupo controle.

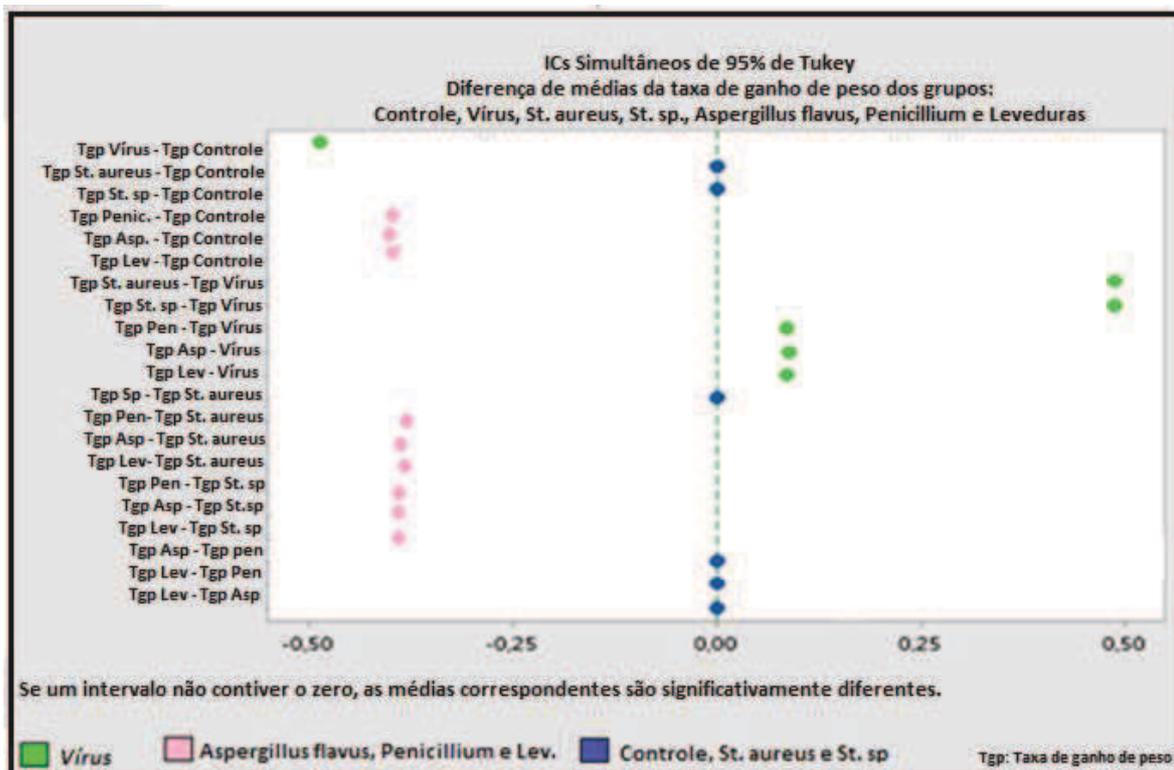


Figura 09: Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, Vírus, *Penicillium sp.*, *A. flavus*, Leveduras, *S. aureus* e *Staphylococcus sp.*

No 9º dia, observou-se que 90% as lagartas contaminadas com o vírus, que já haviam apresentado significativa diminuição no ganho de peso em relação ao controle desde o quinto dia, morreram. Sendo assim, não foi possível utilizar os dados de ganho de peso das lagartas contaminadas com Vírus a partir do dia 9. Entre o 7º e o 9º dia, também morreram 84%, 80% e 90% das lagartas contaminadas com os fungos *Penicillium sp.*, *A. flavus* e leveduras, respectivamente. Sendo assim, as avaliações continuaram apenas com os grupos controle, e os grupos contaminados pelas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* que até o 9º dia não apresentaram diferença nas médias de ganho de peso.

O resultado dos testes simultâneos de Tukey para as diferenças das médias das taxas de ganho de peso do 9º dia apontou que: Estatisticamente, a média das taxas de

ganho de peso do sétimo para o nono dia dos grupos de lagartas contaminadas com as bactérias *S.aureus* e *St. sp* foram iguais entre si e significativamente diferentes do grupo controle, conforme pode ser visto na Figura 10.

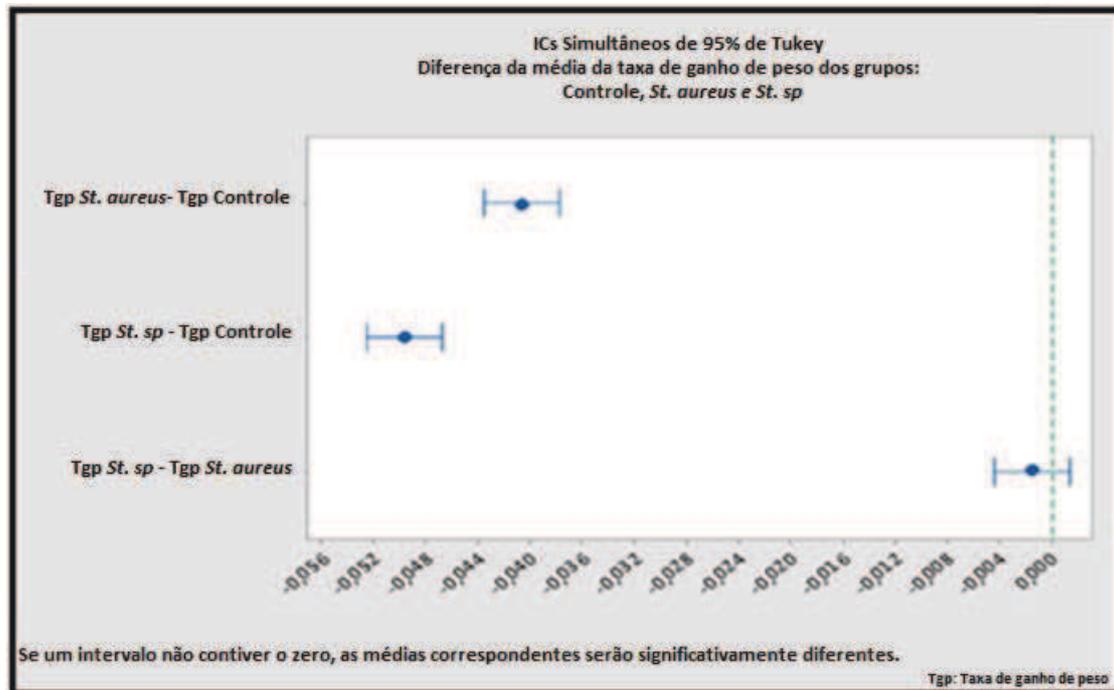


Figura 10: Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, *S. aureus* e *Staphylococcus sp*.

No 11º dia não identificou-se morte de nenhuma lagarta. Novamente a taxa de crescimento dos grupos de lagartas contaminadas por *S. aureus* e *St. sp*. demonstraram iguais entre si e estatisticamente diferentes quando comparadas ao grupo controle, conforme Figura 11.

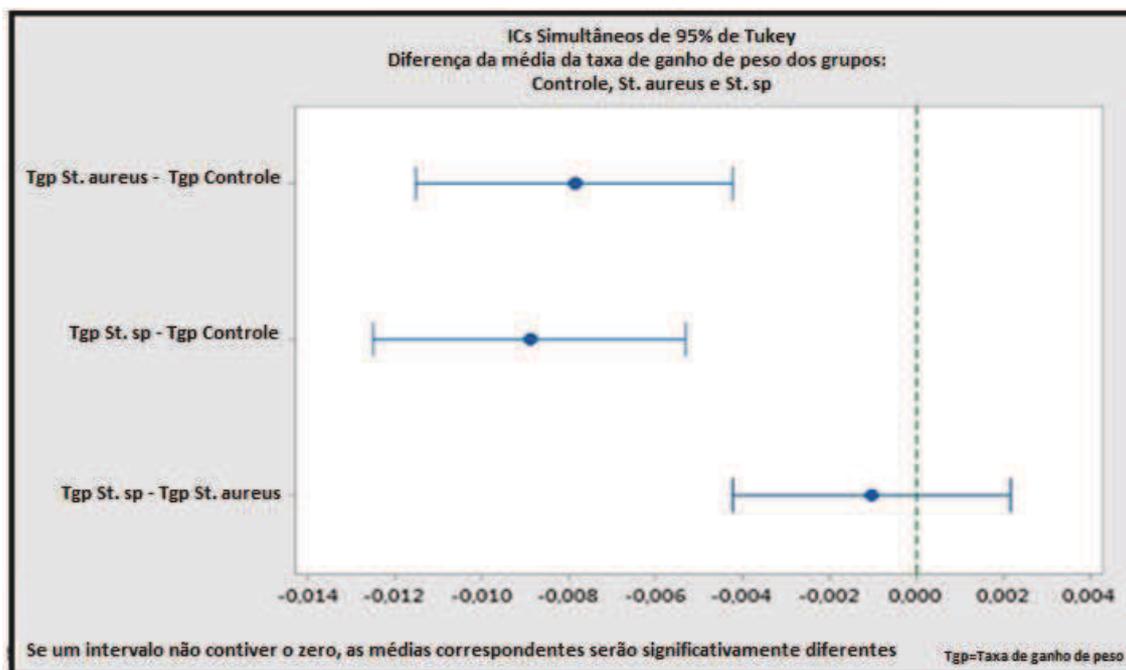


Figura 11: Diferença das médias da taxa de ganho de peso do grupos: Controle, *S. aureus* e *Staphylococcus sp.*

b) Avaliação da injeção de alimentos pelos grupos de lagartas

Para a avaliação da injeção de alimento pelos grupos de lagartas, utilizou-se a taxa consumida de folha e de dieta no decorrer do experimento.

Conforme observado na Figura 12 entre o 1º e o 3º dias, a injeção de alimento foi maior para todos os grupos quando comparado aos demais dias, pois as lagartas se alimentaram de folha. A partir do 3º dia, passaram a se alimentar de dieta e por isso a média de ingestão foi menor.

Na taxa de injeção observada do 3º dia, observou-se diferença significativa apenas na injeção de dieta pelas lagartas contaminadas por *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa na injeção de alimento

No 5º dia, também observou-se uma taxa de ingestão de dieta muito inferior dos grupos contaminados por *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* e uma diminuição significativa na ingestão pelo grupo contaminado por vírus quando comparados ao grupo controle.

No 7º dia, as lagartas dos grupos contaminados por *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* haviam morrido e por isso a avaliação continuou a ser feita

apenas com os demais grupos. Neste dia houve uma diminuição muito significativa da injeção de dieta pelo grupo contaminado por vírus e começou-se a observar uma diminuição da injeção de dieta pelos grupos contaminados por fungos.

No 9º e 11º dias, não foi possível pesar a dieta dos grupos contaminados por *Staphylococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* pois as mesmas estavam se transformando em pupa, e neste estágio, a dieta não poderia ser retirada pois atrapalharia o processo de desenvolvimento. Sendo assim, foi possível avaliar apenas a injeção de alimento do grupo controle.

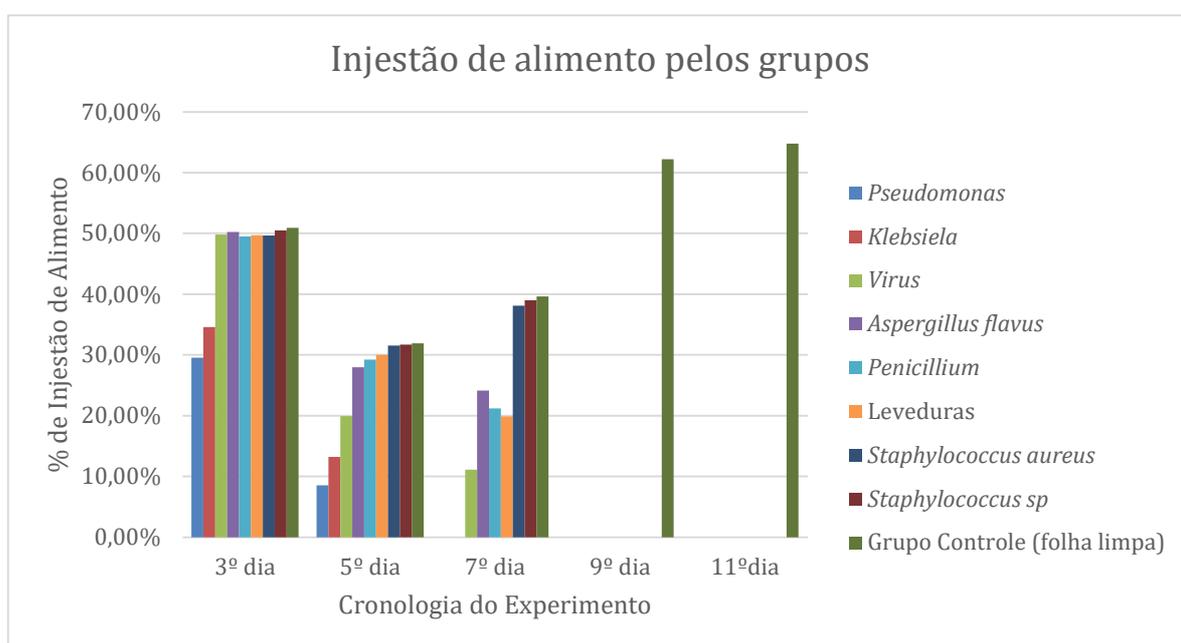


Figura 12: Avaliação da variação de injeção de dieta pelos grupos contaminados

c) Avaliação da cor e morte das lagartas no decorrer do experimento

As avaliações de cor e vida das lagartas foram realizadas nos dias pares.

No segundo dia, não foi possível observar nenhuma diferença em relação à cor, e nenhuma lagarta havia morrido.

No 4º dia, verificou-se que 60% do grupo de lagartas contaminadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e 27% do grupo de lagartas contaminado por *Klebsiella oxytoca* havia morrido. As lagartas mortas apresentaram coloração preta quando comparadas às lagartas vivas.

No dia 6, verificou-se que 65% do grupo de lagartas contaminadas pela bactéria *Klebsiella oxytoca* e 5% do grupo de lagartas contaminado por Vírus havia morrido. As

lagartas mortas pela bactéria *Klebsiella oxytoca* apresentaram coloração preta quando comparadas às lagartas vivas e as lagartas mortas por vírus apresentaram coloração clara quando comparadas às lagartas vivas.

No 8º dia, 79% do grupo de lagartas contaminado por Vírus havia morrido. As lagartas mortas por contaminação viral apresentaram coloração clara/ rosada. Ainda neste dia verificou-se a morte de 60% das lagartas contaminadas por fungos. As lagartas mortas por fungos apresentaram coloração marrom.

No 10º dia, 90% do grupo de lagartas contaminado por Vírus, 84%, das lagartas contaminadas por *Penicillium sp.*, 80% das lagartas contaminadas com *A. flavus* e 90% das lagartas contaminadas com leveduras haviam morrido. Visualmente, conforme pode se observar na Figura 13, as lagartas contaminadas pelas bactérias *Staphylococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* apresentaram aceleração no desenvolvimento, uma vez que algumas delas iniciaram o processo para transformação em pupa, enquanto nenhuma lagarta do grupo controle apresentou tal comportamento.

No 12º não observou-se morte de lagartas e 40% das lagartas contaminadas por *Staphylococcus aureus* e 30% das lagartas contaminadas por *Staphylococcus sp.* viraram pupa, enquanto nenhuma lagarta do grupo controle virou pupa.



Figura 13 : Processo de transformação em pupa do grupo contaminado por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* (A) 9º dia: Lagarta utilizando a dieta para se transformar em pupa . (B) 10º dia: Pupa já formada. (C) 11º dia: Pupa crescida.



Figura 14: Avaliação da diferença de Coloração das lagartas de acordo com cada grupo de contaminação

d) Avaliação Geral

Tabela 03. Monitoramento do desenvolvimento das lagartas após a contaminação com os micro-organismos isolados no trabalho.

Dias de observação	Desempenho das lagartas em comparação ao grupo controle
2º	Não houve nenhuma diferença em relação à cor, tamanho ou quantidade de alimento ingerida.
3º	Observou-se diferença na taxa de ganho de peso entre as lagartas contaminadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>Penicillium sp.</i> . Observou-se diferença significativa na taxa de ingestão de dieta dos grupos contaminados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> .
4º	Morte de 60% do grupo de lagartas contaminadas pela bactéria

-
- Pseudomonas aeruginosa* e 27% do grupo de lagartas contaminado por *Klebsiella oxytoca*. Bactérias mortas apresentaram coloração preta.
- 5° Morte de 90% das lagartas contaminadas com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Diferença significativa no ganho de peso e na ingestão de dieta dos grupo contaminados por *Klebsiella oxytoca* e vírus.
- 6° Morte de 65% do grupo de lagartas contaminadas pela bactéria *Klebsiella oxytoca* e 5% do grupo de lagartas contaminado por Vírus. Lagartas do grupo *Klebsiella oxytoca* morreram com coloração preta as lagartas mortas por vírus apresentaram coloração clara/ rosada.
- 7° Morte de 95% das lagartas contaminadas com a bactéria *Klebsiella oxytoca*. Diminuição muito significativa da ingestão de dieta e ganho de peso pelo grupo contaminado por vírus. Grupos contaminados por fungos começaram a apresentar diminuição no ganho de peso e ingestão de dieta.
- 8° Morte de 79% do grupo contaminado por vírus. Morte de 60% das lagartas contaminadas por fungos. Lagartas mortas por vírus apresentaram coloração clara/ rosada e lagartas contaminadas por fungos apresentaram coloração marrom.
- 9° Morte de 90% do grupo contaminado por vírus, 84%, 80% e 90% das lagartas contaminadas com os fungos *Penicillium sp.*, *A. flavus* e leveduras, respectivamente. Lagartas mortas por fungos apresentaram coloração marrom e lagartas mortas por vírus, coloração clara. Não foi possível avaliar a ingestão de dieta pelos grupos contaminados por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.*, que começaram a se transformar em pupa.
- 10° As lagartas contaminadas pelas bactérias *Staphylococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* apresentaram aceleração no desenvolvimento, uma vez que algumas delas iniciaram o processo para transformação em pupa.
- 11° As lagartas contaminadas pelas bactérias *Staphylococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* apresentaram diferença na taxa de ganho de peso e continuaram o processo de transformação em pupa.
- 12° Não houve nenhuma morte. 40% das lagartas do grupo *Staphylococcus aureus* e 30% das lagartas do grupo *Staphylococcus sp.* viraram pupa, enquanto nenhuma lagarta do grupo controle virou pupa.
-

6. DISCUSSÃO

Foi possível observar que a diminuição na taxa de ingestão corrobora com os resultados de ganho de peso e morte apresentados, ou seja, conforme os grupos tiveram diminuição na sua taxa de ingestão de alimento, diminuíram também a sua taxa de ganho de peso e como consequência apresentaram morte precoce em relação ao grupo controle.

Em relação ao grupo contaminado por Vírus, os resultados de morte e cor vão de acordo com Moscardi e Souza, 2002, que afirmam que após o processo de infecção da lagarta por vírus, o inseto fica debilitado, perdendo a sua capacidade motora e de alimentação e morre entre o 5º e o 8º dias com o corpo descolorido.

Considerando o desenvolvimento dos grupos contaminados por fungos, o gênero *Aspergillus* apresenta algumas espécies que são patogênicas a insetos, mas também tem membros que são patogênicos a vertebrados. *A. flavus* tem sido considerados para uso como entomopatógenos, porém a utilização desses fungos não vem sendo proposta devido a problemas de segurança. Infecções por *Aspergillus* em pássaros, outros animais e seres humanos têm sido amplamente divulgadas (PEREIRA et al., 1998). Não foi encontrada citação, em bibliografia especializada, que refira a presença da espécie *A. flavus* como entomopatogênico a lagartas *S. frugiperda*, mas são relatadas como suscetíveis a este fungo diversas espécies das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Isoptera. (ALVES, 1998). Senna Nunes et al (2002) avaliaram, in vitro, a ação do fungo *A. flavus* em adultos de *Musca domestica Linnaeus* (Diptera: Muscidae) e obtiveram mortalidade de até 100% dos insetos em sete dias de avaliação e com concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹.

A transformação das lagartas contaminadas por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* em pupa, pode ter ocorrido devido alguma exigência biológica. Busato et al, 2002, verificou que populações coletadas em diferentes locais e hospedeiros apresentaram durações do estágio larval diferentes, possivelmente, devido a distintas exigências nutricionais em função de adaptação ao hospedeiro de origem ou devido a distintas exigências ambientais com relação à temperatura e umidade relativa do ar.

Segundo Sarmiento et al, 2002, ao término do seu período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupa de coloração avermelhada, medindo aproximadamente 15mm de comprimento. Portanto, pode-se afirmar que as pupas

formadas nestes grupos apresentaram condições normais de desenvolvimento, conforme pode ser observado na Figura 13.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* foram as que se demonstraram mais prejudiciais à lagarta *S. frugiperda*, causando perda de peso após apenas 3 dias de contaminação.

As lagartas contaminadas por fungos (*A. flavus*, *Penicillium sp.* e *Leveduras*) tiveram comportamentos parecidos, tendo iniciado a diminuição do ganho de peso por volta do 5º dia e morrido por volta do 8º dia.

Os grupos de lagartas contaminadas pelas bactérias *S. aureus* e *St. sp* até o 9º dia não apresentaram nenhuma diferença na taxa de ganho de peso quando comparadas ao grupo controle. Entre o 10º e 12º dias as lagartas desses grupos apresentaram uma diminuição no ganho de peso e visualmente foi possível observar uma aceleração do seu desenvolvimento ao se tornarem pupa antes das lagartas do grupo controle.

Não houve morte de nenhuma das lagartas do grupo controle.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae*. In: **Manual of Clinical Microbiology By Murray PR**, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9 ed. American Society for Microbiology - ASM, Washington, DC, 2007; 1:698-715

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALMEIDA, A.F. Estratégias de produção in vitro de bioinseticida viral: Influências do isolado, da cinética e do modo de operação. 2010. 133p Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Rio Grande Do Norte, Natal.

ANVISA, 2018. 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. Brasília, DF. Disponível em:

https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/iras_moduloTecnologias_MeiosDeCultura.pdf

AUSIQUE J.J.S, 2014. **Caracterização das Comunidades de micro-organismos associados ao mesêntero de *Diatraea sacharalis* e *Spodoptera frugiperda*.** (USP-Piracicaba)

BUSATO, G.R et al. **Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae),** 2006.

BUSATO, G.R et al. Tabela de vida de fertilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 4, p.449-455, 2004.

BENNETT, F. D. **Do introduced parasitoids displace native one?** Florida Entomologist, Lutz, v. 76, n. 1, p. 54-63, 1993

BENEVIDES E MARINHO, 2015. **Degradação de Pestividas por Fungos – Uma Revisão**

BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. **Baculovirus diversity and molecular biology.** **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 35, p. 127- 155, 1990.

BRASIL. LEI Nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre assuntos relativos a agrotóxicos e seus componentes afins, e dá outras providências. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm, acessado em 10 de agosto de 2019.

BUENO, V. H. P.; BERTI FILHO, E. **Controle biológico de insetos com predadores.** **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, p. 41-52, 1991.

CAPINERA J. L. (2008) **Handbook of vegetable pests.** San Diego, Academic Press, 2700p.

CHAVEZ R. et al. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium* **Journal of Biotechnology, Amsterdam**, v 123, p 413-433, 2006.

COSTA, 2016. Caracterização da comunidade bacteriana associada ao trato intestinal de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes dietas.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45 p (**Circular técnica, 21**).

DeBACH, P.; SCHLINGER, I.E. **Biological control of insect pests and weeds**. London: Chapman and Hall, 1964. 844 p.

DeLOACH, C. J. **The effect of habitat diversity on predation. Proceedings Tall Timbers Conference on Ecological Animal Control. Habitat Management**, v. 2, p. 223-242, 1970.

DWAIPAVAN SENGUPTA et al. **Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards**, 2009.

DIEKEMA, D.J et al, 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. **J. Clin. Microbiol.**

EMBRAPA, 2003. Controle Biológico de Pragas: Princípios e Estratégias de Aplicação em Ecossistemas Agrícolas. Disponível em: <file:///D:/Referencias/Tipos%20de%20Controle%20biologico%20elen.PDF>, acessado em 02 de agosto de 2019.

FAO, 2015. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.

EMBRAPA, 2019. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>, acessado em 02 de agosto de 2019.

FRIEDLAND I. et al. Resistance in Enterobacteriaceae: results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 24, 607-61, 2003.

HOWARTH, F. G. Environmental impacts of classical biological control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 36, p. 485-509, 1991.

HUNTER-FUJITA et al. (Ed.). **Insect viruses and pest management**. New York: Wiley, 1998.

IBGE, 2002. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

KAKEHASHI, N. Y.; SUZUCHI, Y.; IWASA, Y. Niche overlap of parasitoids in host-parasitoid systems: its consequence to single versus multiple introduction controversy in biological control. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 21, p. 115-131, 1984.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The baculovirus expression system: a laboratory guide** London; New York: Chapman & Hall. p.xiv, 229 p. 1992.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Amsterdam, Centraalbureau voor Schimmeldatenschappen, 2002.

KONEMAN EW, et al. *Enterobacteriaceae*. In: **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. Editora Médica e Científica Ltda - MDSI, Rio de Janeiro, RJ, 2001:177-261

KO, W.C et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. **Emerg. Infect. Dis.** 8, 160-166, 2002

LOCKHART S.R, et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. **J. Clin. Microbiol.** 45, 3352-3359, 2007.

MOLINARO et al, 2013, **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Volume 3. Capítulos 3 e 4.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L. Baculovirus para o controle de pragas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 21-29, 2002.

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, L.R.; LOPEZ, J.; MACHADO, V. Identification and Comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, n.3, p.394-402, 2007

PALLU, A. P. S. Potencial Biotecnológico de fungos do gênero e interação com cana-de-açúcar. 2010. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências) – USP Piracicaba 2010.

PAYNE, C.C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. *Fortschritte der Zoologie*, v.32, p.183-200, 1986

PEREIRA, R. M. et al. Segurança no emprego de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ. p. 171-191, 1998

PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA, 1999. *Biologia molecular de Baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil*.

PITT J.I. A laboratory guide to common *Penicillium species*. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 2000. 197 p.

PITT J.I.; HOCKING A.D. **Fungi and food spoilage**. 2nd edition. London. Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.

POGUE G M (2002) A world revision of the genus *Spodoptera Guenée* (Lepidoptera: Noctuidae). **Mem Am Entomol Soc** 43: 1-202

PRYA, N.G. et al. Host Plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS One*, San Francisco, v 7, 2012.

ROLIM A.A.S.G, 2014. Microbiota Intestinal e assinatura isotópica de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) como marcadores para identificação da fonte alimentar de imaturos. (USP-Piracicaba)

Sá L A. N. (2016) Controle biológico clássico de pragas e a experiência da Embrapa na quarentena de bioagentes exóticos.

SAMWAYS, M. J. Classical biological control and biodiversity conservation: what risks are we prepared to accept? *Biodiversity and Conservation*, Dordrecht, v. 6, p. 1309-1316, 1997

SARMENTO R.A. et al, 2002. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera Noctuidae) em milho no Brasil.

SARTORETO et al, 2018. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**

SENGUPTA et al, Impacts of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, 2009.

SENNA-NUNES, M. et al. Avaliação in vitro dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de mosca doméstica (Diptera: Muscidae). **Parasitol Latinoam.** v. 57, p. 9-14, 2002.

SHAO Y. et al. In Vivo Pyro SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLoS One*, San Francisco, v 9, 2014.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SOUZA, W. B., Caracterização do *Baculovirus spodoptera* quanto as variações de pH e temperatura, 2015.

VALICENTE, F. H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 119-127, 1989.

VALICENTE, F. H.; COSTA, E. F. Controle da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), com o *Baculovirus spodoptera*, aplicado via água de irrigação. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 61-67, 1995.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, R. B. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 333-337, 1999.

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.

VALICENTE F.H, 2010. Circular Técnica 156. Processo de Formulação do *Baculovirus Spodoptera* em Pó Molhável

VARGA J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus species*. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht. v 110, p 627-640, 2004.

VERÍSSIMO et al, 2016. Pesticide exposure among students and their families in Nova Friburgo, Rio de Janeiro.

VERMELHO, Alane Beatriz et al. Práticas de microbiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

WINN Jr., Washington C. et al. Koneman - Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

WISPLINGHOFF H. et al., 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.** 39, 309-317.