

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Aline Baisso Vieira

**AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE
BACTÉRIAS EM *Alphitobius diaperinus* PANZER 1797
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Taubaté – SP

2021

Aline Baisso Vieira

**AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE
BACTÉRIAS EM *Alphitobius diaperinus* PANZER 1797
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Monografia apresentada ao
Departamento de Ciências Agrárias
da Universidade de Taubaté como
requisito para obtenção do título de
Engenheira Agrônoma.
Área de Concentração: Controle
Biológico
Orientador: Prof. Doutora Adriana
Mascarette Labinas

Taubaté – SP

2021

**Grupo Especial de Tratamento da Informação - GETI
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBi
Universidade de Taubaté - UNITAU**

V658a Vieira, Aline Baisso
 Avaliação de patogenicidade de isolados de bactérias em
Alphitobius diaperinus Panzer 1797 (Coleoptera:
Tenebrionidae). / Aline Baisso Vieira. -- 2021.
 38 f. : il.

 Monografia (graduação) - Universidade de Taubaté,
Departamento de Ciências Agrárias, 2021.
 Orientação: Profa. Dra. Adriana Mascarette Labinas.
Departamento de Ciências Agrárias.

 1. Controle biológico. 2. Alphitobius diaperinus. 3.
Bactéria. I. Universidade de Taubaté. Departamento de
Ciências Agrárias. Curso de Agronomia. II. Título.

CDD – 579.3

Aline Baisso Viera

**AVALIAÇÃO DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS EM
Alphitobius diaperinus PANZER 1797 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Monografia apresentada ao
Departamento de Ciências Agrárias
da Universidade de Taubaté como
requisito para obtenção do título de
Engenheira Agrônoma.

Área de Concentração: Controle
Biológico

Orientador: Prof. Doutora Adriana
Mascarette Labinas

Data: 19/11/2021

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Adriana Mascarette Labinas

Assinatura_____

Prof. Dr. Jose Mauricio Bueno Costa

Assinatura_____

Prof. Dr. Paulo Fortes Neto

Assinatura_____

Dedicatória

Dedico este trabalho à meus avós, Sebastião Joana, Neil de Faria, Inês de Faria, e Maria Lopez. Que de algum lugar vocês possam se orgulhar da pessoa que me tornei.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a meus amados pais, Ângela Maria Baisso Vieira e Anísio Vieira, pela educação que me foi dada, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui e por toda compreensão e amor.

À minha irmã, Alana Baisso Vieira, por todo apoio durante toda a vida.

Aos meus amigos, Junior dos Santos e Rafael Souza: agradeço de coração por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, me incentivando de todas as formas possíveis, por não me deixarem desistir nunca e por estarem ao meu lado nos dias mais sombrios. Sem vocês dois, eu não estaria aqui hoje.

À minha grande amiga, Larissa de Carvalho, por todo o incentivo e apoio durante todo o curso e na vida; muito obrigada por todos os bons e maus momentos que tive o prazer de passar ao seu lado.

À minha orientadora Adriana Mascaratte Labinas, por ter me inspirado e me apoiado durante todo o curso: obrigada por tudo.

Ao Instituto Biológico de Campinas pela oportunidade ímpar que me foi dada.

Aos pesquisadores e aos amigos do Instituto Biológico de Campinas, Luís Garrigós Leite, Maria Elízia e Fernando Baldo: agradeço pela orientação, pelos ensinamentos e por todo incentivo que recebi durante todo o experimento.

“Eu aprendi que a coragem não era a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele”.

Nelson Mandela

RESUMO

O inseto *Alphitobius diaperinus*, conhecido popularmente como cascudinho-do-aviário, tem se disseminado através de grãos armazenados, tornando-se, assim, a praga de maior importância em granjas por todo o mundo. O Brasil como um dos maiores países no setor de avicultura, tem sofrido cada vez mais com a incidência desta praga, já que nos galinheiros do país este inseto encontrou um ambiente extremamente favorável ao seu desenvolvimento. Portanto, este trabalho teve como objetivo testar a patogenicidade de 81 estirpes ou isolados de bactérias (tratamentos), inicialmente, em adultos de *Alphitobius diaperinus* e, em seguida, em larvas, com o intuito de se encontrar um isolado promissor para, futuramente, poder ser utilizado como um agente de controle biológico para esta praga. O experimento foi dividido em 3 bioensaios iniciais, com insetos adultos, para a avaliação da mortalidade semanalmente (por 3 semanas) e um 4º bioensaio, com larvas, para a avaliação da mortalidade diariamente (por 7 dias). No bioensaio 1, os tratamentos 387^a(T2), 137b(T7) e 557^a(T18) apresentaram as maiores taxas de mortalidade com pelo menos 13,33%. Enquanto no bioensaio 2 os tratamentos 459b^{"2}(T25), 287^a(T27), 729b["](T33), mm05(T38), 365B.N.p.6(T43), 365B.N.g.8(T47) e 365c.P.7(T50) foram as que apresentaram maior taxa de mortalidade, acima de 16,66%. Já no bioensaio 3 as bactérias com maior eficiência na mortalidade de *A. diaperinus* foram as 328^a"(T52), 399b(T58), 418^a(T60), 189^{"2}(T62), 194b(T67), 518b(T69), 739a["](T73), 742d["](T74) e 74b^{"2}(T75), que atingiram acima de 23,33% de mortalidade. Os resultados do bioensaio 4 que foi conduzido com os isolados (tratamentos) que apresentaram as maiores taxas de mortalidade nos bioensaios anteriores, indicaram que os isolados 459b^{"2}(T25), e 399b(T58), alcançaram 50% mortalidade, demonstrando, portanto, que possuem maior índice de patogenicidade em *A. diaperinus* durante a fase larval entre todos os isolados bacterianos testados.

Palavras-chave: Controle Biológico, *Alphitobius diaperinus*, Bactéria.

ABSTRACT

The insect *Alphitobius diaperinus*, popularly known as aviary cascudinho has spread through stored grains, thus becoming the most important pest in farms worldwide. Brazil as one of the largest countries in the aquaculture sector has suffered more and more from the incidence of this pest, since in the country's chicken coops this insect has found an environment extremely favorable to its development. Therefore, this work aims to test the pathogenicity of 81 strains of bacteria initially in adults of *Alphitobius diaperinus* and then in larvae, in order to find a promising bacterium for the development of studies and research to be used as a biological control agent for this pest in the future. The experiment was divided into 3 initial bioassays with adult insects, with weekly mortality assessment, for 3 weeks, and a 4th bioassay with larvae in which the mortality assessment was performed daily for 7 days. Where in bioassay 1 the treatments 387^a(T2), 137b(T7) and 557^a(T18) presented the highest mortality rates with at least 13.33%. While in bioassay 2 the bacteria 459b²(T25), 287^a(T27), 729b²(T33), mm05(T38), 365B.N.p.6(T43), 365B.N.g.8(T47) and 365c.P.7(T50) presented the highest mortality rate, reaching above 16.66%. In bioassay 3, the bacteria with the highest efficiency in the mortality of *A. diaperinus* were 328^a(T52), 399b(T58), 418^a(T60), 189²(T62), 194b(T67), 518b(T69), 739a²(T73), 742d²(T74) and 74b²(T75), which reached above 23.33% mortality. For bioassay 4 that was performed with the bacteria that presented the highest mortality rates in previous bioassays, the results express that the isolates 459b²(T25), and 399b(T58) reached 50% mortality. Thus, demonstrating that they have a higher pathogenicity index in *A. diaperinus* during the larval phase among all bacteria tested.

Keywords: Biological Control, *Alphitobius diaperinus*, Bacteria.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do Bioensaio 1.....	29
Tabela 2 - Resultados do Bioensaio 2.....	30
Tabela 3 - Resultados do Bioensaio 3.....	31
Tabela 4 - Resultados do Bioensaio 4.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Preparação de meio de cultura NB	18
Figura 2-Inoculação de bactérias no em meio de cultura	19
Figura 3 - Caldo bacteriano sob agitação.	19
Figura 4 – Preparação de dieta com ração comercial para cachorro.....	20
Figura 5 - Separação dos insetos do substrato vindo do aviário.....	21
Figura 6 - Preparação de placas de Petri com vermiculita.	21
Figura 7 - coleta de <i>A. diaperinus</i> com ajuda de luz.	22
Figura 8 - Aplicação do caldo bacteriano sob placas já preparados com vermiculita e <i>A. diaperinus</i>	23
Figura 9 - Bioensaio 1 montado.	23
Figura 10 - Bioensaio 2 montado.	24
Figura 11 - Bioensaio 3 montado.	25
Figura 12 - Preparação dos frascos com água deionizada para diluição a 10%.....	27
Figura 13 - Aplicação de caldo bacteriano diluído a 10% sob as placas.....	28
Figura 14 - Bioensaio 4 montado.	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Características	11
2.2	Controle Biológico	13
2.3	Bactéria <i>Bacillus spp</i>	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Multiplicação das bactérias.....	17
3.2	Preparação das placas.....	20
3.3	Bioensaio 1	22
3.4	Bioensaio 2	23
3.5	Bioensaio 3	24
3.6	Bioensaio 4	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÃO.....	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, como um dos maiores produtores do mundo no setor de avicultura (ABPA, 2021), vem sofrendo, cada vez mais, com o aumento da incidência do inseto *Alphitobius diaperinus*, já que nos aviários do país esse inseto encontrou um ambiente propício para o seu desenvolvimento: umidade e temperaturas ideais, além de disponibilidade de alimento.

Esse aumento constante na produção brasileira acarretou um número maior de aves em confinamento nos galpões, fazendo com que consequentemente a umidade da cama dessas aves se elevasse, tornando esse ambiente favorável à *Alphitobius diaperinus* (PUVALUK, 2017).

O inseto *Alphitobius diaperinus* é um tenebrionídeo que tem origem africana e se disseminou pelo mundo todo. Este inseto é causador de diversos problemas que afetam direta e indiretamente a produção avícola em vários aspectos, como a diminuição no consumo de ração balanceada, prejudicando o manejo e a sanidade (por serem vetores de patógenos), além de poderem acarretar danos estruturais aos aviários (ALEXANDRE et al, 2008).

O controle dessa praga é considerado difícil, pois são insetos extremamente resistentes. O método de controle químico se torna o mais utilizado, podendo gerar consequências indesejáveis, como o surgimento de populações resistentes de insetos, eliminação de inimigos naturais, além de que, o uso de alguns compostos (como organofosforados e piretróides) podem servir de barreira para a exportação, por exemplo, aos países da União Europeia (FOGAÇA, 2015).

Portanto, torna-se necessário a pesquisa de práticas e métodos de controle que possam contribuir na redução dos danos econômicos deste inseto às criações de aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características

O inseto *Alphitobius diaperinus* PANZER 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido popularmente como cascudinho é um inseto da Ordem Coleoptera, que tem ciclo holometabólico e origem no continente Africano, porém, ao longo do tempo, se tornou um inseto cosmopolita (PUVALUK, 2017) Inicialmente, ele era considerado uma praga secundária em grãos armazenados e atualmente, este inseto-praga está presente em sistemas agropecuários e principalmente, em sistemas de avicultura comercial por todo o mundo, se disseminando através de grãos armazenados ou migrando entre culturas vizinhas (MACIEL, 2019). Segundo demonstrado por Japp, et al. (2010) o ciclo biológico deste inseto se completa em 55 dias, sendo que a temperatura é o elemento que está mais diretamente atrelada ao seu desenvolvimento. Com 22°C seu desenvolvimento é maior, mas com taxa de sobrevivência baixa; já a temperatura de 31°C é a temperatura ideal para o desenvolvimento de larvas, com alta taxa de sobrevivência; entretanto, em temperaturas mais baixas, de aproximadamente 16°C, há uma diminuição na população desse inseto. Logo, temperaturas de 27°C, acompanhadas de umidade relativa de 80% são o binômio ideal para seu desenvolvimento.

Os insetos adultos dessa espécie têm o corpo em formato ovalado e coloração marrom escuro, podendo chegar até 6,83mm; já as larvas são elateriformes e sua coloração é leitosa até o terceiro instar quando, em seguida, passam a ser marrom, de aspecto morfológico afilado, podendo chegar a 13,83mm. Ambos, adultos e larvas, possuem aparelho bucal mastigador (MACIEL, 2019).

Depois de 3 dias da cópula, a ovoposição se inicia e após cinco dias acontece a eclosão das larvas. As fêmeas podem ovopositar até 1.000 ovos; o período larval pode chegar à onze instares mas, normalmente, ocorre em oito; antes de puparem, as larvas penetram o solo, ou em ranhuras, onde permanecem por cinco dias, aproximadamente, até a emergência dos insetos adultos que terão longevidade de um ano, em média (SILVA et al, 2005).

O Brasil, como uns dos maiores produtores do mundo no setor de avicultura (ABPA, 2021), vem sofrendo cada vez mais um aumento da incidência dessa praga já que nos aviários do país esse inseto encontrou um ambiente favorável, com umidade e temperaturas ideais, além de disponibilidade de alimento.

Esse aumento constante na produção brasileira proporcionou um número maior de aves em confinamento nos galpões, fazendo com que, conseqüentemente, a umidade da cama dessas aves aumentasse, tornando esse ambiente favorável à *Alphitobius diaperinus* (PUVALUK, 2017). Nos aviários, pupas e adultos deste inseto se encontram a, aproximadamente, 10cm de profundidade, especialmente, abaixo dos bebedouros e comedouros (JAPP et al., 2010).

A *A. diaperinus* pode causar danos de três naturezas diferentes: sanitários, nutricionais e estruturais (MACIEL, 2019). Os danos sanitários ocorrem devido ao fato de que esse inseto pode transmitir enfermidades, já que é um vetor de agentes patogênicos, como Aspergilose, Coccidiose, bacterioses, viroses e parasitoses, causando doenças como a Newcastle e Gumboro, além da bactéria *Salmonella* (ISADORO et al, 2018). Os danos nutricionais são causados devido ao fato de que entre o quarto e o vigésimo dia de vida da ave se torna o período mais crítico, pois as mesmas enquanto jovens tem o hábito de ciscar mais acentuado, o que também pode ocorrer durante toda sua vida, e ao consumir o cascudinho diminuirão o consumo de ração balanceada, o que gera uma significativa perda no ganho de peso (FOGAÇA, 2015). Além disso, podem surgir nas aves, lesões no trato gastrointestinal, servindo de porta de entrada para diversos patógenos (COSTA, 2018). Os danos estruturais ocorrem durante a fase larval da *A. diaperinus*, pois nesta fase, elas escavam túneis para empuparem, causando estragos no material de isolamento do aviário (PUVALUK, 2017).

Outros efeitos negativos que podem afetar financeiramente a produção são a vocalização, o estresse no período de alimentação e as fezes aguadas, além da presença de larvas na sua composição, o que pode deixar os índices zootécnicos insatisfatórios (SILVA, 2005).

Além disso, devido aos altos níveis de infestação nos aviários do país, existe uma grande dificuldade de controle. Um dos métodos mais utilizados para o manejo dessa praga é o uso de inseticidas sintéticos, com variados tipos de princípios ativos como piretróides, carbamatos e organofosforados, todos com ação neurotóxica e que são aplicados em todas as partes do galinheiro, logo após a saída das aves e retirada da cama no final do lote, criando, assim, um ambiente desfavorável ao desenvolvimento da *A. diaperinus* (MACIEL, 2019).

O método de controle químico pode ajudar a diminuir a incidência desses insetos, porém, pode se tornar um empecilho quando se trata de exportação comercial, pois podem deixar resíduos que não são permitidos na carne de frango pela União Europeia (JAPP et al, 2010), por exemplo.

A utilização incorreta desses produtos pode, ainda, causar danos ao homem e ao meio ambiente como: desequilíbrio biológico, com a morte de inimigos naturais; populações mais resistentes do inseto-praga, contaminação de solo, surgimento de pragas secundárias, que antes não estavam inseridas naquele ambiente e ainda, causar danos à saúde do aplicador (TRINDADE et al., 2015).

Como opção ao método de controle químico, existe, ainda, o método de controle físico que age por meio da temperatura como, por exemplo, o processo de fermentação da cama, que pode ser realizado fazendo-se o enleiramento da cama (COSTA, 2018). Mas de acordo com os autores ISIDRO et al (2018); MACIEL (2019); SILVA (2005), ambos os métodos citados não possuem garantia de 100% de eficácia.

2.2 Controle Biológico

Devido a necessidade de controle surge o método de controle biológico como uma opção para o controle desses insetos-praga, de caráter mais ecológico e com menor risco para o ambiente.

Partindo do princípio de que todos os organismos teriam um inimigo natural, o controle biológico é definido como um acontecimento também natural, onde algumas espécies se alimentam de outras, resultando no controle ou até mesmo extinção de espécies de um determinado ecossistema, segundo Caetano (2019). Porém, esta não é uma prática que nasceu nos tempos atuais; na verdade, o controle biológico já era usado há muitos séculos, por chineses, que utilizavam formigas para controlar pragas (PARRA, 2019).

Como demonstrado por Parra (2019), ainda hoje, existe certa resistência por parte de alguns produtores quanto à utilização do controle biológico, o que se dá, entre outros fatores: pela presença de grandes empresas de agroquímicos como importantes players no agronegócio; por pensarem, equivocadamente, que seria uma técnica muito simples e por isso, sem tanta eficiência quanto os produtos químicos; pelo costume dos agricultores em sempre fazer uso dos mesmos métodos que seus antepassados, ou até mesmo, por se acreditar que o controle biológico pode ser caro e funcionar apenas em longo prazo.

Mas na realidade, o que se vê, é uma expansão das práticas de controle biológico graças ao seu êxito em vários casos registrados pelo mundo (BECHELINI et al, 2017). Ainda assim, esta ferramenta não pode ser vista como a única e exclusiva solução, já que cada área cultivada tem suas particularidades.

Um exemplo de uso de controle biológico ocorreu na África, em 1981, quando plantações de mandioca estavam sendo devastadas pela *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, 1977 (Hemiptera: Pseudococcidae). Usou-se, então, o parasitoide *Apoanagyrus lopezi* De Santis, 1964 (Hymenoptera: Encyrtidae), que foi liberado na Nigéria e logo se espalhou para os países ao redor, fazendo assim, o controle do inseto-praga e tornando-se um dos programas mais bem-sucedidos do mundo (MACIEL, 2019).

Apesar dos pequenos produtores serem responsáveis por grande parte da produção interna do Brasil e da prática do controle biológico já ser

reconhecida por associações de agricultura há muito tempo, o número de políticas públicas que incentivem o uso de outros métodos de controle ainda é reduzido.

Segundo Silva (2020) os inimigos naturais que podem realizar o controle biológico de insetos-praga estão agrupados em cinco categorias distintas: os competidores, que são organismos de vida livre e que competem por sobrevivência com outros insetos; os predadores que consomem insetos que estão em abundância no ambiente; os parasitóides, que parasitam hospedeiros causando a morte destes; os parasitas que, geralmente, não matam seus hospedeiros, mas causam debilidade; e os entomopatógenos, que causam doenças nos insetos, levando-os a morte.

Existem, ainda, formas diferentes de se fazer o controle biológico em áreas agrícolas, como por exemplo, simplesmente, deixando o controle biológico natural operar, causando a mortalidade de populações de insetos-praga por ação de inimigos que ocorrem naturalmente no ambiente ou promovendo a liberação massal de parasitas ou predadores, criados em laboratório, para diminuir, rapidamente, a população da praga (SILVA, 2020)

Contudo, o uso de controle biológico se mostra uma prática promissora devido a sua seletividade, menor possibilidade de o inseto-praga criar resistência e possibilidade desse inimigo natural se multiplicar no ambiente, fazendo com que o controle seja mais duradouro.

2.3 Bactéria *Bacillus spp.*

A bactéria *Bacillus spp.* pertence à Família Bacillaceae e pode ser encontrada, naturalmente, em solos, tecidos de plantas e insetos, pode ser aeróbica ou facultativamente anaeróbica, além de ser uma bactéria Gram-positiva, produzir esporos e possuir flagelos (MACIEL, 2019).

Em 1901, no Japão, o pesquisador Ishiwata descobriu o primeiro isolado de *B. thuringiensis* a partir de lagartas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) doentes (GALZER, 2014); e em 1915, Ernst

Berliner, em Thuringe, na Alemanha, isolou mais uma vez, a bactéria a partir da *Anagasta kuehniella* Zeller 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) (SALLET, 2013).

Em seu ciclo de vida esta bactéria possui duas principais fases: uma em que possui crescimento vegetativo, quando a bactéria se multiplica por bipartição e outra fase em que ocorre a diferenciação da bactéria em esporo, quando produzem uma proteína conhecida como cristal, dotado de propriedades tóxicas contra alguns insetos (GALZER, 2016). Ao final da esporulação, o cristal pode ter as proteínas Cry, Cyt e Vip e as suas respectivas toxinas, correspondendo a até 25% do peso da célula (MACIEL, 2019).

Esses cristais que são formados por um ou mais polipeptídios são conhecidos como proteínas 'Cry' e que, também, são chamadas de endotoxinas (BOBROWSKI, 2003). O fator determinante para a patogenicidade e especificidade da linhagem do *Bacillus* é o tipo de gene Cry funcional que a mesma possui, podendo inclusive ter várias cópias desses genes (CAPALBO, 2005). Ainda segundo Capalbo (2005), as proteínas Cry são protoxinas sem ação entomopatogênica na forma como são sintetizadas e precisam ser reativadas para passarem a ser tóxicas.

De acordo com Maciel (2019), assim que um inseto suscetível ingere os esporos e cristais se dá início ao modo de ação da bactéria *Bacillus*, graças ao teor de alcalinidade do trato digestório na porção do intestino médio dos insetos na fase larval ocorre a solubilização do cristal, liberando protoxinas que ainda estão inativas, em seguida estas são fragmentadas em peptídeos tóxicos e reativadas por proteases que também estão presentes no intestino do inseto, em seguida essas toxinas se ligam a receptores específicos que estão localizados na membrana, sendo que primeiramente se ligam as caderinas que irão permitir que ocorra a oligomerização e posteriormente a ligação com receptores mais específicos que se localizam nas microvilosidades do mesêntero dos insetos, fazendo com que ocorra a inserção da toxina ativa na membrana de forma irreversível, essa ligação então faz com que surja a formação de poros, o que resultara na disfunção osmótica e lise celular, inativando assim as funções da membrana do intestino médio e causando seu rompimento, ocorrendo por fim o contato dos esporos com as fezes e

hemolinfa do inseto, que se torna um meio de cultura viável para a germinação de novos esporos da bactéria *Bacillus* e levando o inseto a óbito.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico - Instituto Biológico - Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, com sede em Campinas, São Paulo, de 10 de agosto até 02 de outubro de 2021. Os isolados bacterianos utilizados neste experimento vieram do banco de preservação do próprio laboratório, que foram coletadas de diversos locais do país, tanto de origem edáficas ou endofíticas. As bactérias foram selecionadas com antecedência em relação ao início da montagem dos experimentos, sendo que 19 entre todos os isolados já haviam passado por análise molecular PCR, para confirmação da família.

O estudo foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado e foi dividido, inicialmente, em 3 experimentos onde se aplicaram a mesma metodologia: 3 repetições para cada tratamento, contendo 10 insetos adultos em cada uma das repetições com a utilização de caldo bacteriano puro sobre o substrato. Após obtenção dos dados dos 3 experimentos iniciais, foram selecionadas os isolados de bactérias que apresentaram os melhores resultados para a realização de um 4º experimento, o qual se diferenciou, em termos de metodologia, pelo fato de que foram utilizados *A. diaperinus* em sua fase larval, com 6 repetições por tratamento e com o caldo bacteriano diluído à 10% de concentração em água.

3.1 Multiplicação das bactérias

Depois de selecionadas as bactérias que seriam testadas nos ensaios, foi preparado o meio de cultura líquido NB (Nutrient Broth), na proporção indicada

pelo fabricante, isto é, 8g de NB para cada litro de água deionizada (Figura 1). Após o preparo do NB, 40mL foram transferidos para frascos tipo reagentes e seguiram para a autoclavagem, por 20 minutos. Neste momento, um frasco contendo apenas água deionizada também era autoclavado com o objetivo de ser usado como um dos dois controles negativos dos bioensaios

Figura 1- Preparação de meio de cultura NB



Fonte: A autora, 2021.

Enquanto os frascos com meio de cultura resfriavam, uma câmara de fluxo laminar era preparada e higienizada com álcool 70° e, em seguida, submetida à luz ultra violeta. Já com todos os materiais necessários preparados e limpos dentro da câmara de fluxo laminar, iniciou-se a inoculação das bactérias dos 19 isolados escolhidos: um isolado em cada frasco. Em seguida, com a ajuda de uma pipeta volumétrica (Figura 2), 100uL do isolado eram coletados e diluído no frasco reagente com 40ml de caldo nutritivo.

Figura 2-Inoculação de bactérias no em meio de cultura.



Fonte: A autora, 2021.

Esse procedimento foi realizado para cada um dos isolados bacterianos selecionados e entre uma inoculação e outra, a ponteira da pipeta era trocada para evitar contaminação. Os frascos com o caldo bacteriano já fechados seguiam para o shaker (Figura 3), ou mesa agitadora, onde permaneceram por 72h, sob agitação constante, à 1600 RPM para crescimento das bactérias.

Figura 3 - Caldo bacteriano sob agitação.

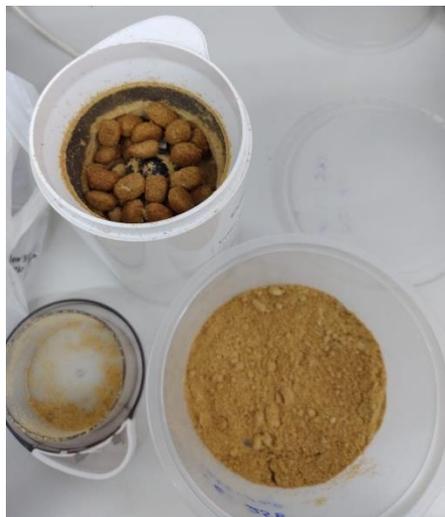


Fonte: A autora, 2021.

3.2 Preparação das placas

Os insetos cascudinhos utilizados nos bioensaios foram obtidos de uma granja comercial, retirados da região abaixo de comedouros e bebedouros, com ajuda de uma pá e acondicionados em recipientes para armazenagem temporária dos insetos, juntamente com uma parcela da cama do galinheiro. Em seguida, os insetos foram conduzidos ao laboratório, onde foram alimentados com ração para cachorro triturada em liquidificador e umidificada com água deionizada, até o momento da realização do experimento (Figura 4).

Figura 4 – Preparação de dieta com ração comercial para cachorro.



Fonte: A autora, 2021.

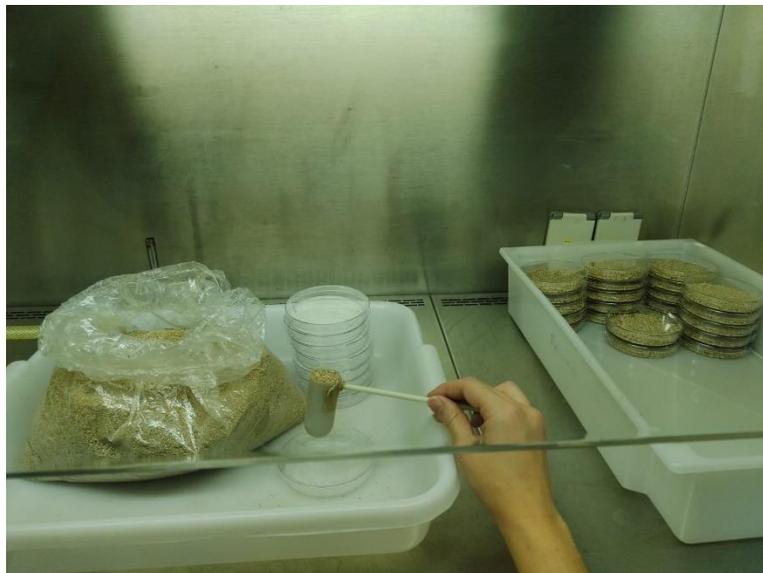
Dentro da câmara de fluxo laminar, 10 insetos adultos foram transferidos para placas de Petri (Figuras 5 e 6), contendo 20g de vermiculita, previamente autoclavada, sendo que para cada tratamento foi usado três repetições nos três primeiros ensaios. Esses procedimentos foram utilizados para os bioensaios 1, 2 e 3.

Figura 5 - Separação dos insetos do substrato vindo do aviário.



Fonte: A autora, 2021.

Figura 6 - Preparação de placas de Petri com vermiculita.



Fonte: A autora, 2021.

Figura 7 - coleta de *A. diaperinus* com ajuda de luz.



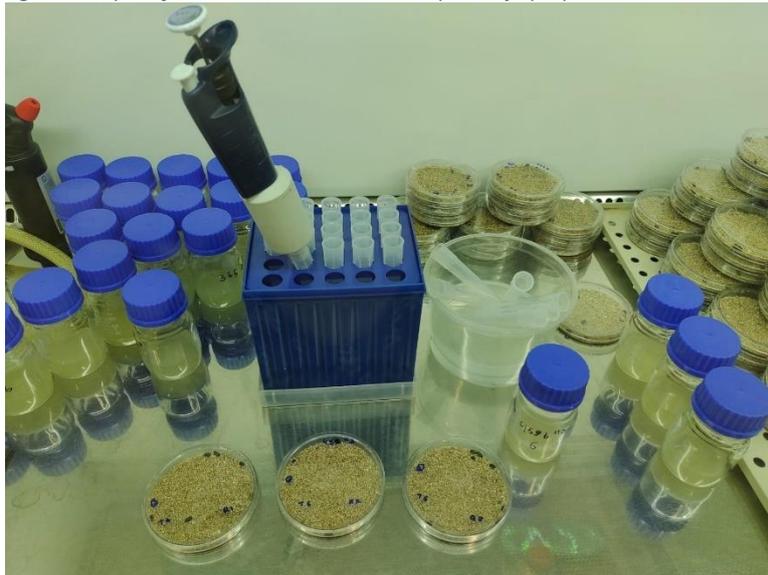
Fonte: A autora, 2021.

3.3 Bioensaio 1

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica dentro da câmara de fluxo laminar, 7mL do caldo bacteriano foram colocados sobre a superfície do substrato (vermiculita) (Figura 8), para cada um dos 21 tratamentos e suas 3 repetições. O mesmo foi feito com os controles negativos (aquele que recebeu apenas o substrato e aquele que recebeu, apenas, água deionizada) e, após esse processo, cada uma das placas foi fechada, individualmente, com plástico filme para evitar perda de umidade e contaminação (Figura 9). O experimento foi mantido em uma sala com temperatura de 25°C e umidade relativa do ar 50±10%. A avaliação da mortalidade foi realizada uma vez por semana, durante 3 semanas.

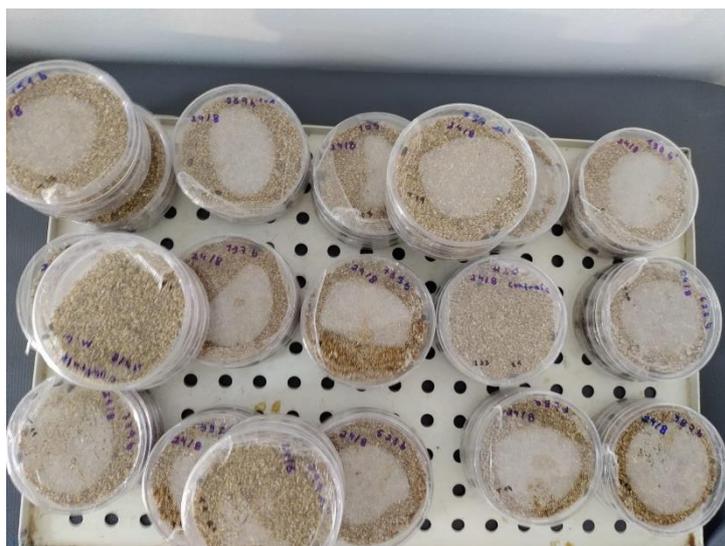
Os isolados selecionados para o Bioensaio 1 foram: 399a"(T1) - 387^a(T2) - 105(T3) - 332a'(T4) - 133b'(T5) - 552b(T6) - 137b(T7) - 735b(T8) - 523b(T9) - 626b(T10) - 739b(T11) - 332a"(T12) - 387d(T13) - 1b"(T14) - 387b(T15) - 742c(T16) - 151b(T17) - 557a'(T18) - 365b¹⁻¹(T19).

Figura 8 - Aplicação do caldo bacteriano sob placas já preparados com vermiculita e *A. diaperinus*.



Fonte: A autora, 2021.

Figura 9 - Bioensaio 1 montado.



Fonte: A autora, 2021.

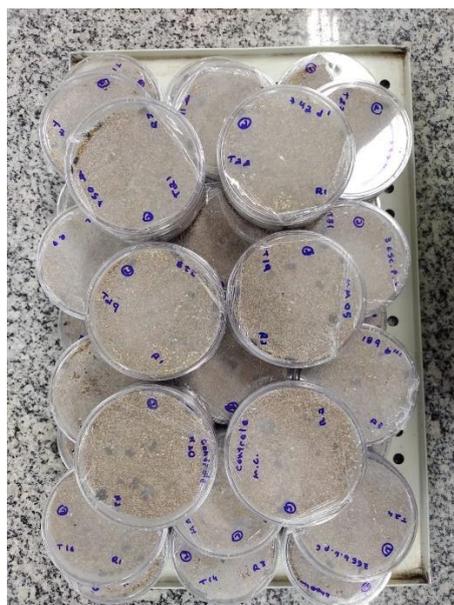
3.4 Bioensaio 2

Na montagem do segundo ensaio (Figura 10), a metodologia aplicada se manteve exatamente a mesma usada no primeiro. Porém, com outros 33 tratamentos, sendo 31 novos isolados bacterianos selecionados, novamente, do banco de preservação de bactérias e 2 controles, um com água deionizada

pura e o outro com meio de cultura NB puro, ambos autoclavados. Após a montagem do experimento, este também foi avaliado 1 vez por semana, durante 3 semanas.

Seleção das bactérias para o 2º bioensaio: MA08(T20) - 749a'(T21) - 447b(T22) - mm13(T23) - 54^a(T24) - 459b²(T25) - 133b"(T26) - 287^a(T27) - *Bacillus subtilis*(T28) - *Chromobacterium*(T29) - *Pseudomonas fluorescens*(T30) - 518b(T31) - 750b"(T32) - 729b"(T33) - *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki(T34) - *Saccharopolyspora spinosa*(T35) - 427b(T36) - 321a(T37) - mm05(T38) - 399a'(T39) - 750a(T40) - 742d'(T41) - 556b'(T42) - 365B.N.p.6(T43) - 189b'''(T44) - 365a(T45) - 328a'(T46) - 365 B.N.g.8(T47) - *Bacillus thuringiensis tenebrionis*(T48) - ma07(T49) - 365 c.P.7(T50).

Figura 10 - Bioensaio 2 montado.



Fonte: A autora, 2021.

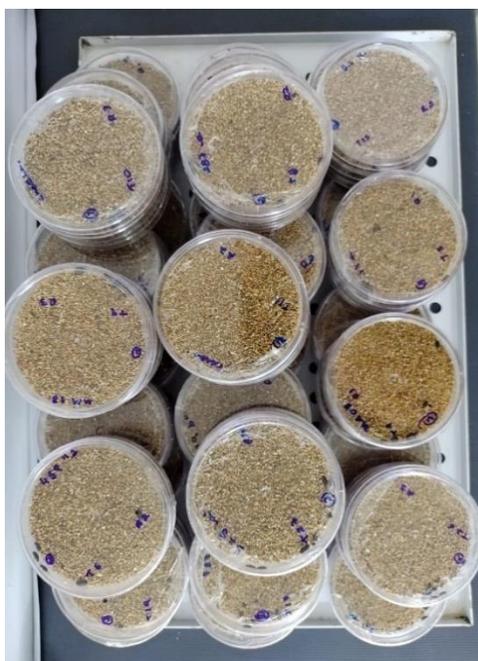
3.5 Bioensaio 3

O terceiro ensaio ocorreu seguindo a mesma metodologia aplicada anteriormente, desde a seleção de novas bactérias, preparação do caldo bacteriano, montagem de placas com os insetos e aplicação das bactérias

inoculadas nas placas com insetos. Este ensaio contou com 31 tratamentos, sendo 29 isolados bacterianos e 2 controles negativos (Figura 11). As avaliações de mortalidade ocorreram da mesma maneira: 1 vez por semana, durante 3 semanas.

Os isolados bacterianos selecionados para o bioensaio 3 foram: 137a"(T51) - 328a"(T52) - 74a(T53) - 189b'(T54) - 729b'(T55) - 328b(T56) - 735a"(T57) - 399b(T58) - 556b"(T59) - 418^a(T60) - 531a"(T61) - 189b^{''}.2(T62) - 160b(T63) - 381^a(T64) - 729c"(T65) - 742a(T66) - 194b(T67) - 186a'(T68) - 518b(T69) - 102b(T70) - 120b(T71) - 102a(T72) - 739a"(T73) - 742d"(T74) - 74b^{'''}.2(T75) - 111b'(T76) - 195a(T77) - 56c(T78) - 365B.P.g5(T79).

Figura 11 - Bioensaio 3 montado.



Fonte: A autora, 2021.

A contagem dos insetos mortos nos 3 ensaios foi realizada no mesmo ambiente onde eles estavam acomodados. Com o auxílio de uma luminária, foram verificadas cada uma das placas de todos os tratamentos e todos os ensaios nos seus respectivos dias, com as placas ainda lacradas. Os insetos mortos se localizavam na superfície do substrato, enquanto os insetos vivos ficavam na sua parte inferior.

Após a montagem de cada um dos ensaios, deu-se início ao processo de preservação de cada um dos isolados bacterianos utilizados para um possível uso posteriormente. Dentro da câmara de fluxo laminar, devidamente higienizada, com uma pipeta volumétrica, foram colocados 400 microlitros de glicerol, em tubos criogênicos e, em seguida, 1,8 ml de cada isolado. Depois, os tubos já identificados foram armazenados em freezer, a -20°C , para preservação.

Ao final de cada um dos 3 ensaios foram selecionadas as bactérias com as maiores taxas de mortalidade para que essas fossem testadas em um último bioensaio: o bioensaio 4.

3.6 Bioensaio 4

Para o 4° ensaio foi definido que seria usada a larva do *A. diaperinus*, devido ao fato de que nesta fase de vida, o inseto seria mais suscetível. Além disso, foram usadas 6 repetições com 10 larvas em cada um dos tratamentos e o caldo bacteriano seria diluído em água, a 10%.

Como nos ensaios anteriores, os fracos reagentes com NB foram preparados e autoclavados para receberem os 21 isolados bacterianos que obtiveram a maior taxa de mortalidade nos ensaios anteriores. Depois de inoculados, os frascos foram para a agitação constante, a 1600 rpm, por 72 horas. Após esse período, foi observado que todas os isolados bacterianos haviam crescido o suficiente no meio de cultura e, assim, deu-se início a diluição a 10%, em água (Figura 12).

Em 22 frascos reagentes foram colocados 90 ml de água deionizada que, em seguida, foram autoclavados. Enquanto os 22 frascos esfriavam após saída da autoclave, a câmara de fluxo laminar foi preparada para a montagem do experimento, após ter sido limpa e higienizada com álcool 70° e sob luz ultra-violeta. Já com todos os materiais necessários previamente limpos e desinfetados colocados dentro da câmara, iniciou-se a montagem do bioensaio 4. Com uma pipeta volumétrica foram coletados 10ml do caldo

bacteriano diluído que já havia se proliferado por 72 horas e colocados no frasco com 90ml de água. Este foi agitado manualmente e com uma outra pipeta volumétrica foi coletado 7ml dessa diluição e aplicado sobre a superfície da placa que já havia sido preparada anteriormente com 20g de vermiculita autoclavada, porém, desta vez, com 10 larvas (Figura 13). As placas foram seladas individualmente com plástico filme. Esse procedimento foi realizado para cada um dos tratamentos, inclusive para o controle negativo com água.

Os isolados bacterianos que participaram do Bioensaio 4 foram: 387^a (T2) - 137b (T7) - 557a' (T18)- 459b^{''}.² (T25) - 287^a(T27) - 729b^{''}(T33) - mm05(T38) - 365B.N.p.6(T43) - 365 B.N.g.8(T47) - 365 c.P.7(T50) - 328a^{''}(T52) - 399b(T58) - 418^a(T60) -189b^{''}.²(T62) - 194b(T67) - 518b(T69) - 739a^{''}(T73) - 742d^{''}(T74) - 74b^{''}.²(T75) -268(T80) - 321b(T81)

No 4° bioensaio, além dos 19 isolados que haviam sido selecionados como sendo os melhores dos ensaios anteriores, foram adicionados outros 2 isolados que ainda não haviam passado por nenhum teste, anteriormente. Foram elas: 268(T80) e 321b(T81).

Figura 12 - Preparação dos frascos com água deionizada para diluição a 10%.



Fonte: A autora, 2021.

Figura 13 - Aplicação de caldo bacteriano diluído a 10% sob as placas.



Fonte: A autora, 2021.

Figura 14 - Bioensaio 4 montado.



Fonte: A autora, 2021.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da mortalidade nos ensaios 1, 2 e 3 foi feita semanalmente ao longo de 3 semanas e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do Bioensaio 1

Tratamento	Taxa de mortalidade (%)
1	0
2	20
3	3,33
4	3,33
5	10
6	6,66
7	13,33
8	6,66
9	0
10	10
11	3,33
12	3,33
13	10
14	10
15	3,33
16	10
17	0
18	16,66
19	6,66
Água	0
M.C.	0

Fonte: A autora, 2021.

Como demonstrado na tabela 1, no primeiro ensaio, os isolados bacterianos de T2, T7 e T18 obtiveram maior taxa de mortalidade ao final da terceira semana, enquanto os demais tratamentos não obtiveram resultados expressivos. Já os tratamentos com controles negativos, tanto com água deionizada quanto com meio de cultura puro, não causaram mortalidade.

Já no Ensaio 2 os tratamentos que provocaram maior taxa de mortalidade foram os T25, T27, T33, T38, T43, T47 E T50, atingindo, pelo menos, 16,66% de insetos mortos

ao longo das 3 semanas. O tratamento T43 foi o mais eficiente, atingindo 43,33% de mortalidade. O tratamento com água deionizada apresentou 10% de insetos mortos e o tratamento com meio de cultura puro apenas 6,66%.

Tabela 2 - Resultados do Bioensaio 2.

Tratamento	Taxa de mortalidade (%)
20	10
21	3,33
22	3,33
23	3,33
24	13,33
25	33,33
26	10
27	33,33
28	3,33
29	6,66
30	10
31	3,33
32	6,66
33	23,33
34	10
35	3,33
36	13,33
37	10
38	36,66
39	6,66
40	13,33
41	13,33
42	10
43	43,33
44	13,33
45	6,66
46	13,33
47	40
48	10
49	13,33
50	16,66
Água	10
M.C.	6,66

Fonte: A autora, 2021.

No bioensaio 3, os tratamentos T52, T58, T60, T62, T67, T69, T73, e T75, apresentaram taxa de mortalidade superior a 23,33%; já os tratamentos T56, T59, T64, T65, T76, além do controle negativo com água deionizada atingiram 0% de mortalidade, e o tratamento T74, ao longo de das três semanas, foi aquele que obteve a maior taxa de mortalidade, com 50% de insetos mortos. Já o tratamento com meio de cultura puro apresentou apenas 6,66% de mortalidade.

Tabela 3 - Resultados do Bioensaio 3.

Tratamento	Taxa de mortalidade (%)
51	16,66
52	36,66
53	13,33
54	6,66
55	3,33
56	0
57	10
58	33,33
59	0
60	36,66
61	10
62	23,33
63	3,33
64	0
65	0
66	10
67	33,33
68	6,66
69	40
70	10
71	6,66
72	6,66
73	33,33
74	50
75	36,66
76	0
77	6,66
78	10
79	10
80	3,33
Água	0
M.C.	6,66

Fonte: A autora, 2021.

Ao final dos 3 primeiros bioensaios os tratamentos que obtiveram as maiores taxas de mortalidade foram selecionados para o bioensaio 4, além de outros dois isolados bacterianos que foram adicionadas: o 268 (T80) e 321b (T81).

No bioensaio 4, onde foram utilizadas larvas de *A. diaperinus* e diluição à 10%, os tratamentos T25 e T58, demonstraram 50% de taxa de mortalidade ao final de 7 dias de avaliação.

Como demonstrado na tabela 4, as larvas de *A. diaperinus* apresentam menor resistência, por isso a média do índice de mortalidade no bioensaio 4 é superior aos bioensaios anteriores, além do fato de que as bactérias usadas já haviam apresentado algum índice de virulência nos ensaios anteriores.

Tabela 4 - Resultados do Bioensaio 4.

Tratamento	Taxa de mortalidade (%)
2	31,66
7	38,33
18	33,33
25	50
27	38,33
33	41,66
38	40
43	30
47	46,66
50	40
52	28,33
58	50
60	40
62	33,33
67	40
69	35
73	28,33
74	33,33
75	21,66
80	43,33
81	40
Água	21,66

Fonte: A autora, 2021.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que para adultos de *A. diaperinus* as bactérias testadas não apresentam efeitos suficientemente satisfatórios, portanto, novos ensaios e estudos com outros isolados bacterianos serão necessários para se obter resultados expressivos.

Os isolados 459b²(T25), e 399b(T58) atingiram índices de 50% de mortalidade de *A. diaperinus* durante sua fase larval, indicando que nesta fase os insetos são mais suscetíveis e por esse motivo, os testes e estudos devem prosseguir com vistas a futura utilização no controle deste inseto-praga.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. RELATÓRIOS ANUAL.

DISPONÍVEL EM: <http://abpa-br.org/wp>

[content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf](http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf)

ALENCAR, RAFAEL VIDO DE. **ASSOCIAÇÃO DE PÓS VEGETAIS E BACILLUS THURINGIENSIS PARA O CONTROLE DE ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).** 2015. 55 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM ZOOTECNIA) - UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, DOIS VIZINHOS, 2015.

Alexandre et al. **CONTROLE ASSOCIADO DE ALPHITOBIOUS DIAPERINUS COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO BEAUVERIA BASSIANA E INSETICIDAS QUÍMICOS.** Universidade Estadual de Londrina-Uel. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.75, n.4, p.481-489, out./dez., 2008

BECHELENI, F. R. C. ET AL. **APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA BACTÉRIA BACILLUS THURINGIENSIS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA LAGARTA DO CARTUCHO SPODOPTERA FRUGIPERDA.** V. 5 N. 1 (2017): REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DA VIDA DISP: APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA BACTÉRIA BACILLUS THURINGIENSIS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA LAGARTA DO CARTUCHO SPODOPTERA FRUGIPERDA | REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DA VIDA (FACULDADECIENCIASDAVIDA.COM.BR)

BOBROWSKI ET AL. **GENES DE BACILLUS THURINGIENSIS: UMA ESTRATÉGIA PARA CONFERIR RESISTÊNCIA A INSETOS EM PLANTAS.** BIOLOGIA • CIENC. RURAL 33 (5) • OUT 2003

CAETANO, J. S. **SISTEMAS AGROECOLÓGICOS: UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE CONTROLE BIOLÓGICO COMO ESTRATÉGIA PARA O MANEJO DE PRAGAS E DOENÇAS.** III Simpósio Ambiental da UEMG- Simpósio Ambiental da Universidade do Estado de Minas Gerais. Unidade Frutal. Agrobiodiversidade: desafios do Antropoceno. p 46-51, 2019.

CAPALBO, D. M. F., ARANTES, O. M. N., SUZUKI, M. T. **BACILLUS THURINGIENSIS. BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO,** UBERLÂNDIA, V. 8, N. 34, P. 76-83, JAN./JUN. 2005. DISP: ALICE: BACILLUS THURINGIENSIS. (EMBRAPA.BR)

COSTA, TAYNARA STOPASSOLI. **CONTROLE DE CASCUDINHO ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (PANZER) EM CAMA DE AVIÁRIO PERANTE EXPOSIÇÃO A MICRO-ONDAS ELETROMAGNÉTICAS.** 2018. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (BACHARELADO EM ZOOTECNIA) - UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, DOIS VIZINHOS, 2018.

GALZER, E. C. W. ET AL. **UTILIZAÇÃO DO BACILLUS THURINGIENSIS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS.** LABORATÓRIO DE ENTOMOLOGIA, UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL/CARVI. (VOLUME 01, 2014) 2016. DIP: UTILIZAÇÃO DO BACILLUS THURINGIENSIS NO

CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS | GALZER | REVISTA INTERDISCIPLINAR DE CIÊNCIA APLICADA (UCS.BR)

FOGAÇA, ISAC. **CONTROLE ALTERNATIVO DA VOLATILIZAÇÃO DE AMÔNIA E DO CASCUDINHO, ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE), EM CAMA DE FRANGO.** DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS (PPGCA) DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA (UNIR) 83P. ROLIM DE MOURA, 2015

ISIDRO, R. ET AL. **UTILIZAÇÃO DO PÓ DE MASTRUZ (CHENOPODIUM AMBROSIODES L.) PARA O CONTROLE DE ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (PANZER, 1797) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM AVIÁRIO.** BRASÍLIA - DF – ANAIS DO VI CLAA, X CBA E V SEMDF – VOL. 13, N° 1, JUL. 2018.

JAPP, ET AL. **IMPORTÂNCIA E MEDIDAS DE CONTROLE PARA ALPHITOBIOUS DIAPERINUS EM AVIÁRIOS.** CIÊNCIA RURAL, V.40, N.7, JUL, 2010.

LIRIANE ROGOVSKI MENDES E MARISTELA POVALUK. **CICLO E CONTROLE DO ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) NO MUNICÍPIO DE QUITANDINHA, PR.** SAÚDE MEIO AMBIENT. V. 6, N. 1, P. 107-122, JAN./JUN. 2017.

MACIEL, RODRIGO MENDES ANTUNES. **PATOGENICIDADE DE BACILLUS THURINGIENSIS PARA ALPHITOBIOUS DIAPERINUS PANZER 1797 (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO.** 2019. 49 F. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM ZOOTECNIA) - UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, DOIS VIZINHOS, 2019.

MARTINS, ARYANE PINHEIRO. **CONTROLE BIOLÓGICO EM CULTURAS AGRICOLAS NO BRASIL UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO PERÍODO DE 2006 A 2017.** 2017. 29 F., IL. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (BACHARELADO EM GESTÃO AMBIENTAL)- UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, PLANALTINA-DF, 2017.

PARRA, J.R.P. **CONTROLE BIOLÓGICO NA AGRICULTURA BRASILEIRA. DEPARTAMENTO DE ENTOMOLOGIA E ACAROLOGIA, ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.** ENTOMOLOGICAL COMMUNICATIONS, 1, 2019.

Povaluk, M. **Ciclo e controle do Alphitobius diaperinus (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) no Município de Quitandinha, PR.** *Saúde E Meio Ambiente: Revista Interdisciplinar*, 6(1), 107–122. 2017

SALLET, LUNALVA AURÉLIO PEDROSO. **SELEÇÃO DE ESTIRPES DE BACILLUS THURINGIENSIS PARA O CONTROLE DE ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (COLEOPTERA : TENEBRIONIDAE).** 2013. XVII, 92 F., IL. TESE (DOUTORADO EM BIOLOGIA MOLECULAR)— UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, BRASÍLIA, 2013.

SILVA A.S., HOFF G., DOYLE R.L., SANTURIO J.M. & MONTEIRO S.G. 2005. **CICLO BIOLÓGICO DO CASCUDINHO. ALPHITOBIOUS DIAPERINUS EM LABORATÓRIO.** ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE. 33: 177-181.

SILVA, R. J. **CONTROLE BIOLÓGICO: UMA REVISÃO CIENCIOMÉTRICA**— ANÁPOLIS: CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS – UNIEVANGÉLICA, 2020. 38P.

TRINDADE, R.C.P ET AL. **EXTRATOS AQUOSOS DE INHAME (DIOSCOREA ROTUNDATA POIRR.) E DE MASTRUZ (CHENOPODIUM AMBROSIODES L.) NO DESENVOLVIMENTO DA LAGARTA-DO-CARTUCHO-DO-MILHO SPODOPTERA FRUGIPERDA (J.E. SMITH, 1797)**. REV. BRAS. PLANTAS MED., BOTUCATU, V. 17, N. 2, P. 291-296, JUNE 2015 . AVAILABLE FROM <[HTTP://WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S1516-05722015000200291&LNG=EN&NRM=ISO](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000200291&lng=en&nrm=iso)>. ACCESS ON 30 APR. 2021. [HTTPS://DOI.ORG/10.1590/1983-084X/13_082](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_082).