



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**JORRANES FELICIANO SOUZA**

**COMPATIBILIDADE ENTRE O FUNGO FILAMENTOSO ENTOMOPATOGENICO**  
***Aspergillus* sp. NA01 COM INSETICIDAS USADOS NO MANEJO INTEGRADO DA**  
**LAGARTA-ROSCA *Agrotis ipsilon* (HUFNAGEL, 1766)**  
**(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2020**

**Jorranes Feliciano Souza**

**COMPATIBILIDADE ENTRE O FUNGO FILAMENTOSO ENTOMOPATOGÊNICO  
*Aspergillus* sp. NA01 COM INSETICIDAS USADOS NO MANEJO INTEGRADO DA  
LAGARTA-ROSCA *Agrotis ipsilon* (HUFNAGEL, 1766) (LEPIDOPTERA,  
NOCTUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adna Cristina Barbosa de Sousa

JOÃO PESSOA-PB

2020

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catálogo e Classificação**

S725c Sousa, Jorranes Feliciano.

Compatibilidade entre o fungo filamentoso entomopatogênico *aspergillus* sp. Na01 com inseticidas usados no manejo integrado da lagarta-rosca *agrotis ipsilon* (hufnagel, 1766) (lepidoptera: noctuidae) / Jorranes Feliciano Sousa. - João Pessoa, 2020.

41 f. : il.

Orientação: Adna Cristina Barbosa  
de Sousa  
TCC (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Controle biológico. Efeito fungitóxico. Inseticida. I. Sousa, Adna Cristina Barbosa. II. Título

UFPB/CCEN

CDU 60(043.2)

**Jorranes Feliciano Souza**

**COMPATIBILIDADE ENTRE O FUNGO FILAMENTOSO ENTOMOPATOGÊNICO  
*Aspergillus* sp. NA01 COM INSETICIDAS USADOS NO MANEJO INTEGRADO DA  
LAGARTA-ROSCA *Agrotis ipsilon* (HUFNAGEL, 1766) (LEPIDOPTERA,  
NOCTUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adna Cristina Barbosa de Sousa (UFPB – CBIOTEC)  
**(Orientadora)**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Farias de Almeida (UFPB – CBIOTEC)  
**(Examinadora)**

---

Msc. Nathalia Souza Bezerra (Setor de Educação Ambiental - Parque  
Zoobotânico Arruda Câmara)  
**(Examinadora)**

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me acompanharam e me incentivaram na jornada da graduação, a todos os professores e professoras que me guiaram no aprendizado, aos amigos que fiz, que me apoiaram e compartilharam dos momentos bons e ruins, e em especial aos meus pais que providenciaram tudo para que eu pudesse fazer uma graduação que me fizesse feliz.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adna Cristina Barbosa de Sousa, ao Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal (LGM Biotec) e Ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

“Tudo bem não saber todas as respostas, é melhor admitir ignorância do que acreditar em verdades que são falsas. Fingir saber de tudo fecha as portas para que a gente enxergue a realidade da forma como ela é”.

Neil de Grasse Tyson

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Lagarta-rosca <i>Agrotis ipsilon</i> .....	14
<b>Figura 02</b> – Ciclo de vida da lagarta-rosca <i>Agrotis ipsilon</i> .....	15
<b>Figura 03</b> – Dano de <i>Agrotis ipsilon</i> em lavoura de milho.....	17
<b>Figura 04</b> – Mecanismo de infecção e patogenicidade de fungos entomopatogênicos do gênero <i>Aspergillus</i> .....	20
<b>Figura 05</b> – Estrutura química do Malathion.....	21
<b>Figura 06</b> – Estrutura química do Diazinon.....	22
<b>Figura 07</b> – Estrutura química do Fipronil.....	23
<b>Figura 08</b> – Micrografia de <i>Aspergillus</i> sp. NA01 no meio ágar-Sabouraud-dextrose. A- Conidióforo; B- Vesícula; C- Fiálides; D- Conídios; e E- Micélio cenocítico.....	28
<b>Figura 09</b> – Aspecto macroscópico da colônia de <i>Aspergillus</i> sp. NA01 no meio ágar-Sabouraud-dextrose (Grupo controle).....	30
<b>Figura 10</b> – Aspecto macroscópico da colônia de <i>Aspergillus</i> sp. NA01 no meio ágar-Sabouraud-dextrose contendo o inseticida Malathion.....	30
<b>Figura 11</b> – Viabilidade dos conídios de <i>Aspergillus</i> sp. NA01 produzidos no meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contendo inseticidas. 1 – Controle positivo; 2 – Malathion; 3 - Fipronil e 4 – Diazinon.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Efeito dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon sobre o crescimento vegetativo (mm) de <i>Aspergillus</i> sp. NA01.....	28
<b>Tabela 02</b> – Efeito dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon sobre a esporulação e viabilidade dos conídios (%) de <i>Aspergillus</i> sp. NA01.....	30
<b>Tabela 03</b> – Classificação dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon quanto à toxicidade <i>in vitro</i> sobre de <i>Aspergillus</i> sp. NA01.....	32

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>09</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Aspectos biológicos da lagarta-rosca <i>Agrotis ipsilon</i> e seu impacto na agricultura..</b>	<b>14</b>
3.1.1. Ciclo de vida da lagarta-rosca <i>Agrotis ipsilon</i> .....	15
3.1.1.1. Ovo.....	16
3.1.1.2. Larva.....	16
3.1.1.3. Pupa.....	16
3.1.1.4. Adulto.....	16
3.1.2. Hábitos alimentares da lagarta-rosca <i>Agrotis ipsilon</i> .....	17
<b>3.2. Mecanismos de controle de insetos-praga e ação entomopatogênica sobre os hospedeiros.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. Manejo integrado de pragas com inseticidas.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. . Inseticidas utilizados no controle da <i>Agrotis ipsilon</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Características vegetativas e reprodutivas de <i>Aspergillus</i> sp. NA01.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Efeito do Fipronil, Malathion e Diazinon sobre o crescimento vegetativo e reprodutivo de <i>Aspergillus</i> sp. NA01.....</b>	<b>27</b>
<b>5.3 Análise da esporulação e viabilidade dos conídios de <i>Aspergillus</i> sp. NA01 produzidos nos meios de cultura contendo Fipronil, Malathion e Diazinon.....</b>	<b>30</b>

<b>5.4 Classificação quanto à compatibilidade <i>versus</i> toxicidade <i>in vitro</i>, do Fipronil, Malathion e Diazinon sobre <i>Aspergillus</i> sp. NA01.....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>

SOUZA, Jorranes Feliciano. Compatibilidade entre o fungo filamentosso entomopatogênico *Aspergillus* sp. NA01 com inseticidas usados no manejo integrado da lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

## RESUMO

*Agrotis ipsilon* é uma praga no Brasil capaz de danificar diversas espécies vegetais de relevância econômica. Tendo em vista isso, há interesse e procura por formas de controlar esta praga com maior eficácia e seletividade, para que haja diminuição nas perdas da produtividade, e também que não prejudique o ambiente. O manejo integrado de pragas é um método promissor, pois utiliza inseticidas compatíveis com fungos que promovem patogenicidade em insetos. Sendo assim, o trabalho avaliou a fungitoxicidade de inseticidas utilizados no controle da *A. ipsilon* sobre o fungo *Aspergillus* sp. NA01. Para realização das análises, foram utilizados os inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon, utilizados em suas concentrações subletais. Foram avaliados os parâmetros de crescimento vegetativo, conidiogênese e viabilidade dos conídios. Para essas análises foram utilizados o meio de cultivo ágar-Sabouraud-dextrose com os inseticidas acrescidos de antibiótico e dois meios contendo apenas ágar-Sabouraud-dextrose mais antibiótico para o controle positivo e sem antibiótico para o controle negativo. O experimento foi avaliado durante 10 dias em temperatura ambiente. Foi observado que não houve diferença de crescimento entre os grupos controles e o crescimento no meio contendo Diazinon. Já os inseticidas Malathion e Fipronil apresentaram uma redução significativa no crescimento vegetativo. Para o teste de viabilidade dos conídios, foi feita uma suspensão de conídios em 40 mL de água destilada mais uma concentração de  $1 \times 10^4$  conídios/mL<sup>-1</sup>, e desta suspensão foi inoculado 20 µL em placas de petri. Os três inseticidas apresentaram uma redução na esporulação e na viabilidade quando comparados com os grupos controles. Sendo essa redução mais expressiva observada no inseticida Malathion (23.67 %). Foi observado que os inseticidas Fipronil e Diazinon apresentaram uma viabilidade semelhante dos conídios de 54.10 % e 55.90 % respectivamente. Portanto, apenas o Fipronil e Diazinon foram considerados compatíveis com o isolado *Aspergillus* sp. NA01 *in vitro* e possuem potencial para serem explorados no manejo integrado para controle de *A. ipsilon*.

**Palavras-chave:** Controle biológico. Efeito fungitóxico. Inseticida, Pesticida.

SOUZA, Jorranes Feliciano. Compatibility between the entomopathogenic filamentous fungus *Aspergillus* sp. NA01 with insecticides used in the integrated management of the threadworm *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae). Course Completion Work (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

## ABSTRACT

*Agrotis ipsilon* is a pest in Brazil capable of damaging several plant species of economic relevance. In view of this, there is an interest and a search for ways to control this pest with greater efficiency and selectivity, so that there is a decrease in productivity losses, and also that it does not harm the environment where these methods are applied. Currently, a promising method is the integrated pest management using insecticides that are compatible with fungi that promote pathogenicity in insects, aiming to decrease their population and incidence. Thus, the work evaluated the fungitoxicity of insecticides used to control *A. ipsilon* on the fungus *Aspergillus* sp. NA01. For the analysis, the insecticides Fipronil, Malathion and Diazinon were used, used in their sublethal concentrations. Vegetative growth, conidiogenesis and conidia viability parameters were evaluated. For these analyzes, the agar-Sabouraud-dextrose culture medium was used with the insecticides plus antibiotics, and two control medium containing only agar-Sabouraud-dextrose plus antibiotics for the positive control, and without antibiotics for the negative control. The experiment was evaluated for 10 days at room temperature. It was observed that there was no difference in growth between the control groups and the growth in the medium containing Diazinon. The insecticides Malathion and Fipronil showed a significant reduction in vegetative growth. For the conidia viability test, a suspension of conidia was made in 40 mL of distilled water plus a concentration of  $1 \times 10^4$  conidia/mL<sup>-1</sup>, and of this suspension 20 µL was inoculated. The three insecticides showed a reduction in sporulation and viability when compared to the control groups. This reduction being more expressive observed in the insecticide Malathion (23.67 %). It was observed that the insecticides Fipronil and Diazinon showed similar conidia viability of 54.10 % and 55.90 % respectively. Therefore, only Fipronil and Diazinon were considered compatible with the *Aspergillus* sp. NA01 *in vitro* and has the potential to be explored in integrated management to control *A. ipsilon*.

**Key words:** Biological control. Fungitoxic effect. Insecticide. Pesticide.

## 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* é considerada uma praga no Brasil e ataca diversas espécies vegetais de relevância econômica, tais como hortaliças, cana-de-açúcar, milho, algodão, alho, batata doce, feijão, fumo, trigo além de algumas plantas daninhas. Atualmente, uma das formas mais comuns de controlar este inseto é fazendo uso de inseticidas químicos, que pode proporcionar uma forma de seleção natural, gerando insetos resistentes a esses químicos. Desta forma, há necessidade de estudos visando o desenvolvimento de novas estratégias e alternativas para o manejo destas pragas, que visem evitar a criação de pragas mais resistentes (BENTO et al., 2007). Uma das alternativas para este problema é a utilização de produtos fitossanitários que possuam seletividade aos insetos-praga, e que sejam compatíveis a fungos entomopatogênicos, que promovam uma forma de controle que possibilite a preservação dos inimigos naturais e, ao mesmo tempo, promova o controle dos insetos-praga (HUANES-CARRANZA; WILSON-KRUGG, 2016).

A seletividade/compatibilidade nos programas de manejo integrado de pragas é um conceito importante no momento da escolha do inseticida ou da maneira de aplicá-lo, visando à preservação dos inimigos naturais, espécies inofensivas à cultura e a outros organismos benéficos que convivem no agroecossistema. A aplicação de produtos fitossanitários pode afetar a população de entomófagos entre eles, os fungos, visto que várias espécies de fungos atuam no controle da população de insetos que causam danos econômicos às culturas. Dentre esses micro-organismos, destacam-se os fungos entomopatogênicos como alternativa viável no controle de insetos no país (SEYE et al., 2014; HUANES-CARRANZA; WILSON-KRUGG, 2016).

Os fungos entomopatogênicos possuem a capacidade de controlar, naturalmente, as populações de insetos, pois agem no alvo específico, não deixam resíduos nos alimentos, são seguros para o trabalhador rural, protegem a biodiversidade e preservam os polinizadores. Estima-se que cerca de 80 % das enfermidades que acometem os insetos têm como agente causal os fungos. As funções ecológicas desses fungos fazem deles agentes de extrema importância para a proteção de diversos cultivares. Os fungos são organismos de morfologia variável, que podem ser unicelulares como as leveduras ou multicelulares, constituindo assim um conjunto filamentosos conhecido como micélio. O gênero *Aspergillus* engloba mais de 200 espécies, algumas das quais são capazes de produzir metabólitos secundários com grande

potencial entomopatogênico e entomotoxigênico (ROSSI-ZALAF et al., 2008; MANTZOUKAS, 2020).

A utilização associada de produtos fitossanitários e fungos entomopatogênicos para o controle de pragas é capaz de auxiliar na redução da sua população e incidência, devido a capacidade dos produtos fitossanitários de causar estresse nos insetos aumentando assim a eficiência do fungo nestas pragas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de inseticidas utilizados no controle da *A. ipsilon* sobre o desenvolvimento do fungo filamentosamente entomopatogênico *Aspergillus* sp. NA01.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito de inseticidas utilizados no controle da *A. ipsilon* sobre o desenvolvimento do fungo filamentosso entomopatogênico *Aspergillus* sp. NA01.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

✓ Avaliar o efeito dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon sobre a germinação dos conídios, crescimento vegetativo, reprodução e esporulação (conidiogênese) de *Aspergillus* sp. NA01, *in vitro*;

✓ Avaliar a viabilidade dos conídios produzidos por *Aspergillus* sp. NA01 no meio de cultura contendo os inseticidas;

✓ Classificar os três inseticidas quanto à toxicidade sobre *Aspergillus* sp. NA01, *in vitro* de acordo com Alves, 1998;

✓ Determinar se há compatibilidade entre os inseticidas e *Aspergillus* sp. NA01 *in vitro*, para uso no controle biológico da lagarta-rosca.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Aspectos biológicos da lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* e seu impacto na agricultura

A lagarta-rosca é um inseto-praga de grande relevância ao redor do mundo devido aos seus hábitos alimentares, já que se trata de uma espécie que é altamente polifágica e se alimenta de uma grande quantidade de espécies vegetais de relevância econômica (Figura 01) (BINNING et al., 2015).

É um inseto pertencente à ordem Lepidoptera da família Noctuidae. É considerada uma das pragas subterrâneas prejudiciais a mais de 100 espécies vegetais. Entre elas destacam-se: milho, trigo, algodão, batata doce, soja, tomate, cebola, rúcula, chuchu, feijão, entre outras (JOSHI et al., 2020). Em alguns casos, a produção de culturas como o milho pode causar redução de rendimento de até 7 % e prejuízos de 3,5 % até 6,25 % em plantações de batata. A lagarta pode ser encontrada enterrada próximo às plântulas e pode cortá-la junto à base. Penetra no colmo criando galerias, que favorecem o tombamento, bem como o aparecimento de estrias nas folhas, sintoma denominado de “coração morto”, ocasionando diminuição da produtividade e perfilhamento (NAKANO, 2011; MUNIB, 2018).

**Figura 01:** Lagarta-rosca *Agrotis ipsilon*.

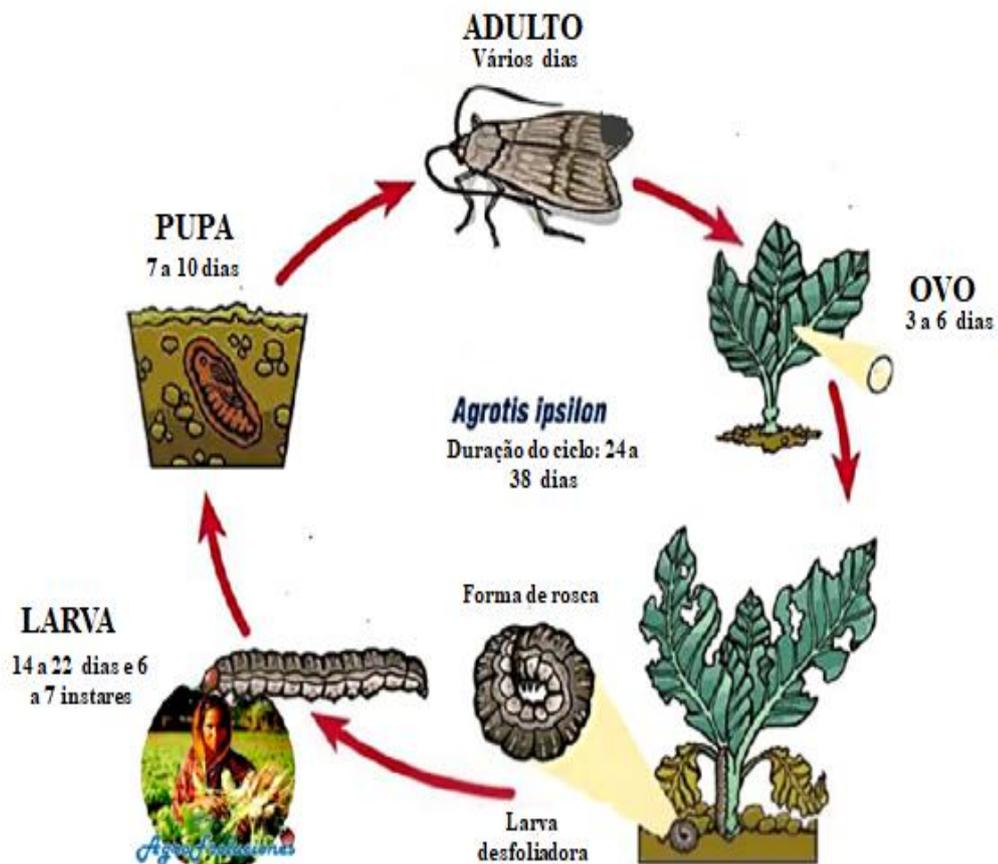


Fonte: <https://www.manejebem.com.br/doenca/praga-lagarta-rosca-agrotis-ipsilon>

### 3.1.1. Ciclo de vida da lagarta-rosca *Agrotis ipsilon*

*A. ipsilon* é um inseto holometábolo, ou seja, possui vários estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida, sendo estes estágios: ovo, larva, pupa e adulto, que pode compreender do início ao fim uma média 38 dias de vida (Figura 02) (BENTO et al., 2007). O ciclo de vida completo do inseto possui uma importância no seu impacto, pois cada estágio de vida do inseto influencia no seu impacto a culturas economicamente importantes (CAPINERA, 2007).

**Figura 02:** Ciclo de vida da lagarta-rosca *Agrotis ipsilon*.



Fonte: Sementes Agrocere: Manual de pragas do milho, soja e algodão, 2017.

#### **3.1.1.1. Ovo**

O ovo é o primeiro estágio e tem o intuito de desenvolver o indivíduo da fase de embrião até a fase de larva. Geralmente são colocados sob as plantas que servem de alimento para as lagartas, assim que elas se diferenciam. Os ovos são esféricos, possuem de 1 a 2 mm de diâmetro, coloração amarelada e ficam mais escuros à medida que o inseto se desenvolve (MINAS et al., 2013). Podem ser colocados em grupos de 4 a 15 ovos por vez. Estes ovos possuem um período de incubação de 3 a 6 dias, dependendo da temperatura (KRITI, DAR, KHAN, 2014).

#### **3.1.1.2 Larva**

A fase larval é a fase responsável pelos maiores danos aos plantios, e compreende o estágio de vida mais longo do inseto, podendo durar de 14 a 22 dias no qual a lagarta se diferencia em até 7 instares. Trata-se da fase de vida do inseto onde o estilo de vida se baseia em se alimentar vorazmente, com o objetivo de acumular o máximo de nutrientes o mais rápido possível, para que possa prosseguir às próximas fases de seu desenvolvimento. Também se trata da fase de vida mais vulnerável do inseto, pois as lagartas possuem uma movimentação lenta, e um exoesqueleto menos espesso, tornando mais fácil para predadores e patógenos (KRITI, DAR, KHAN, 2014).

#### **3.1.1.3 Pupa**

Ao se preparar para entrar em estágio de pupa, a larva cria um casulo, ao redor de si mesma. A pupa é a fase mais resistente do inseto e pode durar de 7 a 10 dias. É uma fase imóvel onde o inseto não se alimenta, cujo objetivo é desenvolver o indivíduo adulto. Possui uma coloração verde quando recém formada, e ao maturar, adquire uma coloração escura (KRITI, DAR, KHAN, 2014).

#### **3.1.1.4 Adulto**

O estágio adulto é a última etapa da vida do inseto (mariposa). Esta fase possui o único objetivo que é a reprodução. São os adultos que são responsáveis pela disseminação da

praga em termos geográficos, já que a mesma fêmea pode colocar ovos em diversas plantas ao longo de vastas áreas da plantação (KRITI, DAR, KHAN, 2014). Os adultos possuem hábitos noturnos, alimentam-se de néctar e possuem longevidade de aproximadamente 12 dias, podendo colocar em média mais de 1000 ovos (BENTO et al., 2007).

### 3.1.2 Hábitos alimentares da lagarta-rosca *Agrotis ipsilon*

*A. ipsilon* é uma espécie que possui hábitos noturnos, permanecendo abaixo do solo durante o dia, imóvel e sai para se alimentar a noite. Durante este tempo, a lagarta ataca plantas em nível de solo, cortando a planta ainda em estado muito jovem, algumas vezes levando a planta cortada para o subsolo para se alimentar com maior segurança. Em apenas uma noite, esta lagarta pode cortar diversos brotos, causando elevada perda às plantações (SHOWERS, 1997).

A maior parte do dano causado deve-se ao fato de que a lagarta tende a não consumir a planta inteira e sim atacar brotos em sequência, e também, a natureza do dano varia de acordo com o tamanho da lagarta, onde lagartas menores escalam as plantas e fazem pequenos buracos nas folhas, e lagartas maiores tendem a cavar túneis dentro da planta, tanto na parte superior, quanto no subsolo da planta (Figura 03) (JOSHI et al., 2020).

**Figura 03:** Dano de *Agrotis ipsilon* em lavoura de milho.



Fonte: Ivan Schuster, 2017.

### 3.2. Mecanismos de controle de insetos-praga e ação entomopatogênica sobre os hospedeiros

Um das formas de controle de pragas mais utilizadas no mundo são os inseticidas químicos, que geralmente são compostos sintetizados de maneira artificial, que possuem o objetivo de causar um controle imediato da praga alvo (GALLO et al., 2002, VON NOWAKONSKI, 2014). Podem agir de diversas maneiras no organismo alvo, podendo desregular o metabolismo celular da praga, até mesmo atacar o sistema nervoso central de pragas como insetos (TINGLE et al., 2020).

Isso gera um maior interesse das indústrias pelo uso destes defensivos agrícolas devido a sua ação rápida, contudo, tal uso pode levar a uma série de danos a longo prazo. Ferrari (1985) cita que os principais efeitos colaterais causados pela agricultura química podem ser a contaminação de produtos alimentícios, contaminação de rios, aceleração do processo de desertificação, prejuízos ou extinção de populações tanto de animais quanto vegetais nativas as regiões de implementação, além de causar danos à saúde dos agricultores que usam estes químicos.

Atualmente existe uma preocupação crescente com o uso de inseticidas químicos. Tal preocupação deve-se ao fato de que diversos destes compostos são de natureza sintética, e muitos tem sido proibidos de serem comercializados devido a comprovações de seus danos a saúde humana e ao meio ambiente em longo prazo. Tendo em vista essa preocupação, buscam-se alternativas para uso destes químicos, sendo assim, uma das alternativas é o biocontrole de pragas das plantações utilizando fungos entomopatogênicos. Os fungos agem de forma natural, pois já estão presentes no ambiente, e assim, não representam riscos ao ambiente como os inseticidas químicos fazem (TINGLE et al., 2020).

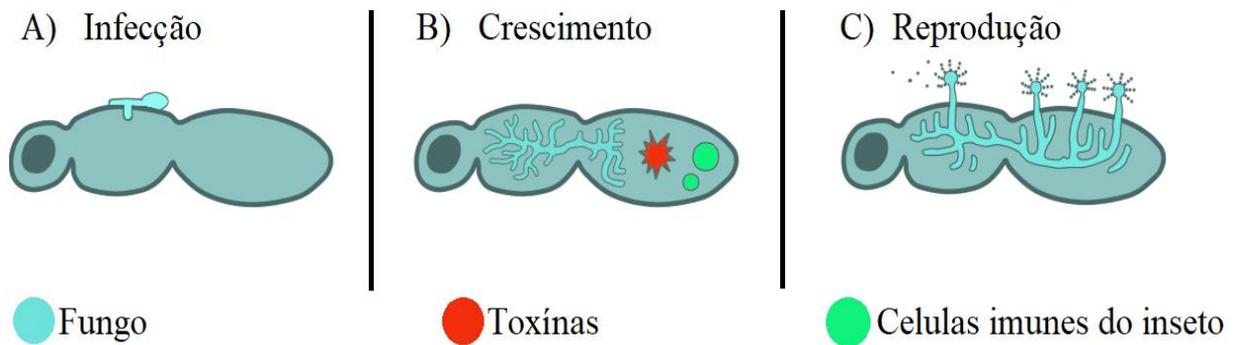
*Aspergillus* é um gênero de fungos que compreende cerca de 200 espécies descritas, e possui espécies de interesse econômico. Os fungos deste gênero possuem diversos estilos de vida, são mais conhecidos por causar deterioração de alimentos, contudo algumas espécies de *Aspergillus* possuem ação entomopatogênica, podendo levar a morte dos insetos hospedeiros (SEYE et al., 2014).

A patogenicidade dos fungos pode ser afetada por diversos fatores, entre eles a espécie do fungo e a virulência. Algumas espécies entomopatogênicas de *Aspergillus* são utilizadas para biocontrole de pragas, como *Aspergillus flavus* e *A. clavatus* que possuem ação comprovada contra o pulgão das ervilhas, *Acyrtosiphon pisum* (SEYE et al., 2014) e também

linhagens de *Aspergillus* foram eficazes contra a mosca do melão *Bactrocera cucurbitae* (YE YANG et al., 2015).

O mecanismo de ação dos fungos entomopatogênicos nos hospedeiros inicia com a infecção, ou seja, quando o esporo do fungo entra em contato com a cutícula do inseto e adere à cutícula utilizando de moléculas sintetizadas pelo fungo conhecidas como adesinas (Figura 04). Estas moléculas estão intimamente relacionadas com a virulência do fungo, já que linhagens de fungos como *Metarhizium anisopliae* que não sintetizavam estas moléculas apresentaram menor virulência (PAVA-RIPOLL et al., 2011). Após a adesão, o esporo aguarda até que as condições como temperatura, umidade estejam favoráveis para que ocorra a germinação. Ao germinar, o conídio produz um tubo germinativo que posteriormente forma um apressório, que é a estrutura responsável pela infecção do hospedeiro (HAJEK; DELALIBERA, 2010). Este apressório penetra a cutícula e acessa a hemocele do inseto, para que assim o fungo possa extrair os nutrientes do hospedeiro e causar a infecção. Para isto, essa estrutura utiliza de enzimas que auxiliam a degradação da cutícula, facilitando assim, a passagem do fungo, e fornecendo nutrientes para continuar o trajeto até o interior do hospedeiro (VEGA et al., 2010). Uma vez dentro da hemocele, o fungo precisa lidar com o sistema imune do organismo, para lidar com este problema, são produzidas toxinas que possuem a função de suprimir as respostas imunes, além de realizar mudanças conformacionais na parede celular, que evita que o fungo seja reconhecido pelo sistema imune do inseto, além de contar com a ajuda de mais alguns tipos de proteases que degradam a resposta humoral do inseto (Lectinas, proteínas e peptídeos de defesa). Tendo superado os desafios do sistema imune do inseto, o fungo inicia o processo de absorção de nutrientes para se desenvolver e completar a infecção (MORA, CASTILHO, FRAGA, 2018). Uma vez que os nutrientes do inseto hospedeiro tenham se esgotado, em especial as fontes de nitrogênio, e as condições de umidade e temperatura estejam favoráveis, as hifas crescem em direção a região exterior do inseto, geralmente áreas onde a cutícula possua menor espessura, ou estruturas como os espiráculos. Após emergir do inseto, o fungo inicia dentro de 24 a 48 horas o processo de esporulação, dando continuidade ao ciclo de vida do fungo (SRIVASTARA et al., 2009).

**Figura 04:** Mecanismo de infecção e patogenicidade de fungos entomopatogênicos do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Autor, 2020.

### 3.3. Manejo integrado de pragas com inseticidas

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de inseticidas químicos tem gerado grande preocupação em relação à saúde pública e a geração de insetos mais resistentes. Para contornar esse problema, surgiu o conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) que se trata de um conjunto de técnicas que visam suprimir populações de pragas economicamente impactantes, tendo como principal intuito a preservação do meio natural onde estas técnicas são empregadas (JUNIOR, 2019; DA MOTA et al, 2020).

O conceito de MIP não é novo, foi inicialmente abordado no décimo segundo Congresso Internacional de Entomologia, Londres (KOGAN, 1998). Uma das características atuais do MIP é a sua natureza holística, sendo assim, não é uma técnica que vem pronta para utilização imediata, mas requer um estudo detalhado tanto do agricultor quanto do consultor agrícola sobre as condições da agricultura local, as técnicas a serem aplicadas, e a viabilidade destas técnicas, para que possa ser aplicado o conjunto mais adequado e viável para lidar com a praga alvo.

O uso de inseticidas químicos em conjunto com fungos entomopatogênicos é um conceito já estudado em algumas culturas economicamente importantes, como exemplo o trabalho de Batista Filho e colaboradores (2003), onde foi avaliado a toxicidade de inseticidas utilizados no controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (Hubner) sob espécies de fungos entomopatogênicos que afetam este inseto.

A utilização conjunta desses fungos com inseticidas tem mostrado resultados promissores, que resulta em uma maior integridade do conceito de MIP. Diversos autores relatam sucesso, e maior eficiência quando as duas formas de combate são utilizadas em

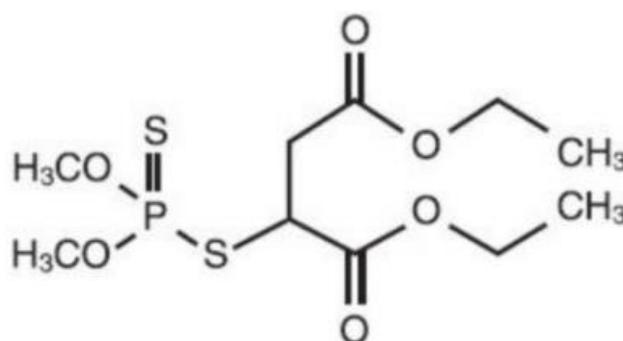
conjunto. Ahmed et al. (2020) mostraram que utilizar isolados fúngicos de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em conjunto com inseticidas para realizar o controle do inseto *Oxycarenum hyalinipennis* mostrou uma maior eficiência do que o uso individual das duas técnicas (Costa, 2020). Purwar e Sachan (2006) demonstraram que *B. bassiana* em conjunto com o inseticida endossulfan mostraram ser mais letais a *Spilarctia oblique*. A ação de produtos fitossanitários sobre entomopatógenos pode variar desde a inibição do crescimento vegetativo e da conidiogênese, até a ocorrência de mutações genéticas, alterando sua virulência. Ao se considerar a estratégia do controle associado, deve-se atentar para os possíveis efeitos fungitóxicos dos produtos fitossanitários a serem utilizados (ALVES et al., 1998).

### 3.4. Inseticidas utilizados no controle da *Agrotis ipsilon*

Devido a gama de plantas que a *A. ipsilon* ataca, diversos inseticidas são aplicados para realizar seu controle. Dentre estes compostos, destacam-se os organofosforados (OF), piretróide e metilcarbamato de oxima cujo o uso depende da cultura alvo (AGROFIT, 2019). Os inseticidas da classe organofosforados são químicos que derivam dos ácidos, fosfórico, fosfônico ou fosfínico, e são a classe de inseticidas mais utilizadas na agricultura. Contudo, o uso exacerbado destes químicos tem causado grande poluição ao meio ambiente, aos animais e ao homem (ABDOLLAHI, 2004; TERRY, 2012; SHAH e IQBAL, 2010).

Dentre os inseticidas OF, um dos mais utilizados é o Malathion (Fosforoditionato de 0,0-dimetil-S-1,2bis-(etoxicarbonil)-etila) (Figura 05) devido a sua baixa toxicidade em mamíferos e alta eficiência no combate as pragas, comparados a outros químicos da classe dos OFs.

**Figura 05:** Estrutura química do Malathion.



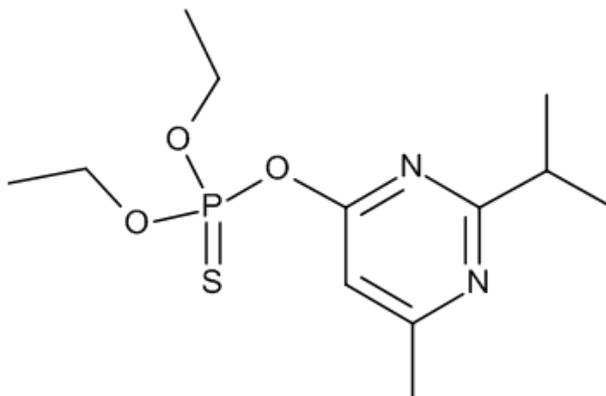
Fonte: BURATTI et al., 2004.

Ao ser absorvido pelo corpo, o Malathion é degradado, por exemplo, em malaoxon por enzimas do citocromo P-450 no fígado, sendo que o malaoxon é o principal metabólito responsável pelos efeitos tóxicos causados ao organismo (BURATTI et al., 2004).

O principal sintoma da contaminação do organismo de animais é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) havendo assim, uma hiperestimulação dos receptores colinérgicos, (muscarínicos e nicotínicos) tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, levando assim a conhecida “síndrome colinérgica”, que causa sintomas como: náusea, vômito, lacrimejamento, salivação, bradicardia, miose e podendo levar a morte por ocorrer falência respiratória quando absorvido em doses elevadas (SANTOS, 2013).

Outro inseticida amplamente utilizado no controle da *A. ipsilon*, utilizado tanto na agricultura quanto na horticultura, é o Diazinon (0,0-dietil-0-[2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil] fosforotiotato) (Figura 06), composto pertencente à família dos OFs, sendo assim, seus efeitos colaterais são altamente similares aos outros químicos da família. Possui seu efeito ligado a inibição irreversível da AChE, causando a “síndrome colinérgica”, além de interferir no sistema do citocromo P450 no fígado humano (SAMS et al., 2003).

**Figura 06:** Estrutura química do Diazinon.

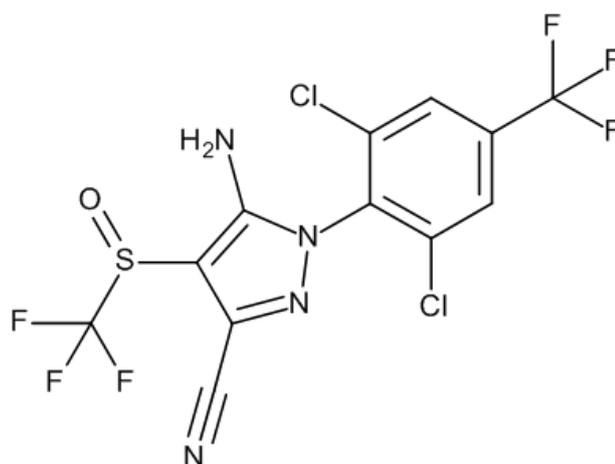


Fonte: <https://www.lgcstandards.com>

Em torno dos anos de 1980, alguns grupos de insetos vinham desenvolvendo resistência a grupos de inseticidas como os OFs e piretróides, o que levou tanto a um aumento no uso dos inseticidas, quanto à utilização de outras classes de inseticidas (ALYOKHIN et al., 2008). Uma das classes de inseticidas adotados que possui amplo uso até os dias atuais é a

classe dos fenilpirazois, onde nesta classe se destaca o Fipronil (5- amino- 1- (2, 6-dicloro-  $\alpha$ ,  $\alpha$ - trifluoro- *p*- tolil)- 4-trifluorometilsulfinilpirazol-3- carbonitrila) (Figura 07), que é um dos fenilprazos mais utilizados e que permite uma gama de aplicações. O Fipronil, assim como os inseticidas da classe dos neonicotinoides são moléculas relativamente pequenas e altamente solúveis em água, que ao serem aplicados na planta, o químico e seus metabolitos circulam pelo xilema da planta, que permite que se dispersem pelos outros tecidos, sendo assim, o químico permanece por um período de tempo provendo proteção contra qualquer praga que entre em contato com a seiva da planta (MAGALHAES et al., 2009).

**Figura 07:** Estrutura química do Fipronil,



Fonte: <https://www.lgcstandards.com>

O fipronil é um inseticida que apresenta alta toxicidade a diversas classes de insetos, além de ser pouco tóxico aos invertebrados. Contudo, o Fipronil tem sido associado à genotoxicidade e citotoxicidade em peixes, devido ao seu amplo uso em plantações de arroz, que precisam ser mantidas submersas, contaminando assim, a água com o inseticida (ABD EL HAKIM, 2019). O mecanismo de ação do Fipronil é descrito por Simon-Delso et al. (2015) como sendo um antagonista de um canal de cloro mediado por GABA, levando o organismo a sofrer de insuficiência neurológica, e posteriormente levando a morte do indivíduo, além de ser relacionado com a quebra de processos enzimáticos relacionados com a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (VIDAU et al., 2011).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal (L G M Biotec), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus* I, João Pessoa, Paraíba, no ano de 2020.

**4.1. Produtos fitossanitários:** foram testadas três formulações comerciais de inseticidas registrados para o controle *A. ipsilon*: Fipronil (Regent 800 WG, Rhodia Agro Ltda), Malathion (100 mL, DIPIL, Agroline) e Diazinon (40 PM, Agener União). Considerando-se a utilização de concentrações de 0,3 g/L e 0,8 g/L do inseticida comercial Fipronil, 3 mL/L do Malathion e 0,25g/L do Diazinon dos inseticidas para associação com fungos entomopatogênicos no controle de *A. ipsilon*, as formulações foram testadas na concentração média recomendada.

**4.2. Origem do isolado fúngico:** foi utilizado um isolado fúngico de *Aspergillus* sp. NA01, pertencente à coleção de cultura do L B M Biotec/UFPB/CBIOTEC.

**4.3. Meio de cultura e manutenção da cultura fúngica:** ágar-Sabouraud-dextrose 2 % (5 g/L de peptona de carne, 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona de caseína e 15 g/L de ágar bacteriológico. pH 5,6 ± 0,1 a 25 °C). As amostras foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose 2 %, onde as culturas foram mantidas à temperatura ambiente de 10 a 15 dias e, em seguida, sob refrigeração a 4 °C.

**4.4. Exame microscópico do isolado fúngico:** foi utilizada a metodologia descrita por Lopes et al. (2008), adaptada. Inóculo da cultura fúngica foi transferido para placas de Petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose e coberto com lamínulas previamente flambadas. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e as lamínulas com micélio aderido foram retiradas sucessivamente, nos períodos de 24 – 48 – 96 – 120 horas após o início do experimento, colocadas invertidas sobre uma lâmina esterilizada, coradas com lactofenol, identificadas e analisadas ao microscópio óptico.

**4.5. Avaliação do efeito dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon sobre o crescimento vegetativo e esporulação de *Aspergillus* sp. NA01:** a metodologia utilizada baseou-se no trabalho de Rashid et al. (2012). O meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose 2

% (p/v) foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos, aproximadamente. Após esfriar por alguns minutos em temperatura ambiente, foi adicionado ao meio o antibiótico penicilina. Os inseticidas foram previamente filtrados utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro com o intuito de remover os contaminantes. Os frascos contendo os meios ágar-Sabouraud-dextrose, penicilina e os inseticidas foram agitados manualmente durante um minuto para homogeneização desses componentes e, depois, foram vertidos em placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do meio, as placas foram mantidas em refrigerador à temperatura de 4 °C durante 24 horas e, posteriormente, foram inoculadas com o isolado fúngico com o auxílio de uma alça de platina (um ponto por placa). O controle negativo foi feito cultivando-se o isolado em meio ágar-Sabouraud-dextrose e o controle positivo foi feito cultivando-se o isolado em meio ágar-Sabouraud-dextrose mais penicilina, sem os inseticidas. Os experimentos foram realizados em triplicata e as placas foram mantidas à temperatura de  $25 \pm 2$  °C durante 10 dias. Ao final, foi avaliado o diâmetro das colônias fúngicas com o auxílio de uma régua milimetrada e foi feita a contagem do número de conídios produzidos por colônia em câmara de Neubauer ao microscópio óptico.

**4.6. Teste de viabilidade dos conídios produzidos no meio de cultura contendo os inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon:** os conídios produzidos no meio ágar-Sabouraud-dextrose contendo Fipronil, Malathion e Diazinon foram diluídos em tubos falcon contendo 40 mL de água destilada atingido uma concentração de  $1 \times 10^4$   $\text{MI}^{-1}$ . A partir desta suspensão, foi inoculado 20 µL em placas de Petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose em triplicata e posteriormente incubadas por 18 horas ( $T = 29 \pm 1$  °C). Após este período de incubação, foi realizada a contagem das colônias em microscópio óptico (ampliação de 400x). Para o teste de viabilidade dos conídios, um grupo controle foi preparado pela cultura dos isolados em meio ágar-Sabouraud-dextrose com (controle positivo) e sem (controle negativo) o antibiótico, sem os inseticidas.

**4.7. Classificação dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon quanto à toxicidade sobre *Aspergillus* sp. NA01:** para a classificação dos inseticidas quanto a toxicidade sobre *Aspergillus* sp. NA01 *in vitro* foi utilizado o modelo proposto por Alves (1998), onde: T = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto; CV = porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha; ESP = porcentagem de esporulação com relação à testemunha ( $T=20(\text{CV}) + 80(\text{Esp})/100$ ). A partir do valor de T, o

produto químico é classificado como muito tóxico (0 a 30), tóxico (31 a 45), moderadamente tóxico (46 a 60) ou compatível (> 60).

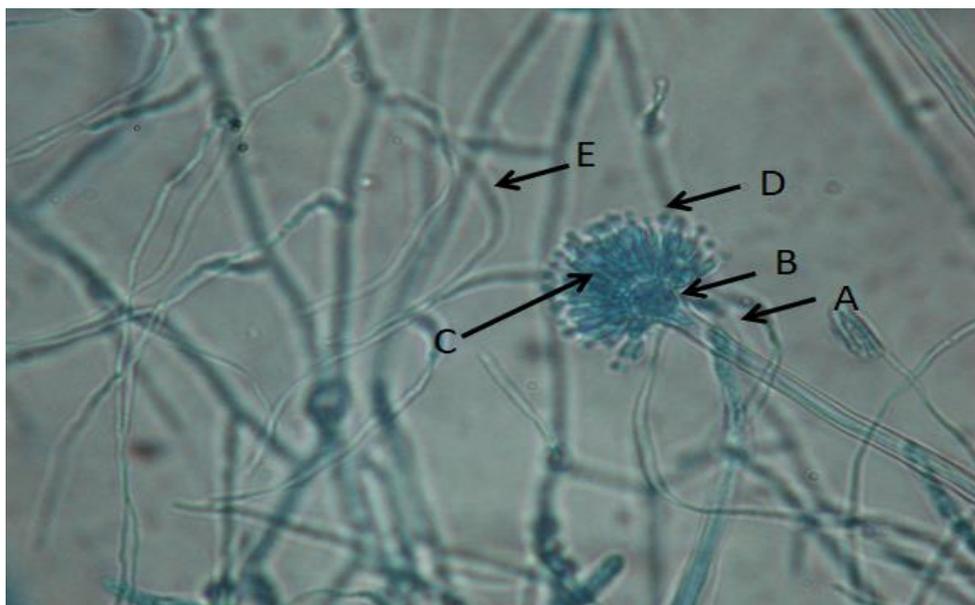
**4.8. Análises estatísticas:** Os dados foram analisados quanto à variância (ANOVA), seguido do teste de variação múltipla de Duncan, onde  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Características vegetativas e reprodutivas de *Aspergillus* sp. NA01

*Aspergillus* sp. NA01 em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose apresentou as estruturas vegetativas e reprodutivas características do gênero fúngico (Figura 08).

**Figura 08:** Micrografia de *Aspergillus* sp. NA01 no meio ágar-Sabouraud-dextrose. A- Conidióforo; B- Vesícula; C- Fialídes; D- Conídios; e E- Micélio cenocítico.



Fonte: Sousa, A. C. B. (2018).

As espécies de *Aspergillus* geralmente apresentam conidióforo cenocítico, conectado a uma hifa vegetativa. O conidióforo estende-se até a vesícula, onde as células conidiogênicas são formadas, originando conídios globosos, hialinos, unicelulares e que se apresentam dispostos em cadeias (COSTA et al., 2014)

### 5.2. Efeito do Fipronil, Malathion e Diazinon sobre o crescimento vegetativo e reprodutivo de *Aspergillus* sp. NA01

O crescimento micelial de *Aspergillus* sp. NA01 foi avaliado a cada 3 dias durante 10 dias em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contendo os inseticidas Fipronil, Malathion

e Diazinon (Tabela 01). Foi observado que não houve diferença no crescimento de *Aspergillus* sp. NA01 entre os grupos controles e o crescimento no meio contendo Diazinon. Contudo, houve diferença estatística entre os grupos controle, e os grupos contendo os inseticidas Malathion e Fipronil, os quais apresentaram redução no crescimento vegetativo e reprodutivo.

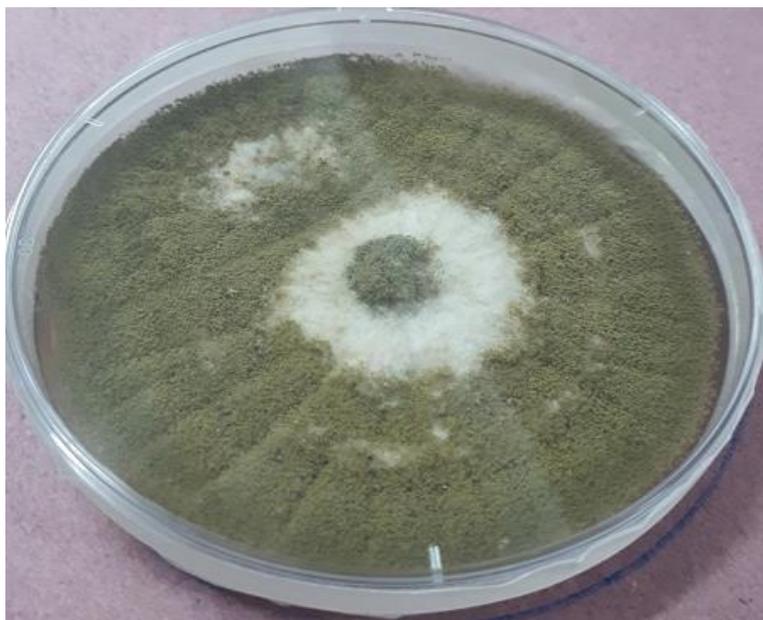
**Tabela 01:** Efeito dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon sobre o crescimento vegetativo (mm) de *Aspergillus* sp. NA01.

<b>Tratamentos</b>	<b>Crescimento vegetativo (mm)</b>	<b>Redução do crescimento vegetativo (%)</b>
<b>Controle negativo*</b>	8,50 ± 0,45 a	0,00 ± 0,00 a
<b>Controle positivo**</b>	8,50 ± 1,34 a	0,00 ± 0,00 a
<b>Fipronil</b>	6,13 ± 0,99 b	2,37 ± 0,10 b
<b>Malathion</b>	6,55 ± 0,19 b	1,95 ± 0,78 b
<b>Diazinon</b>	8,40 ± 1,10 a	0,1 ± 0,10 a

\*Controle negativo (meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose sem antibiótico mais o fungo),  
 \*\*Controle positivo (meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose com antibiótico mais o fungo).  
 Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de variação múltipla de Duncan (P<0,05).

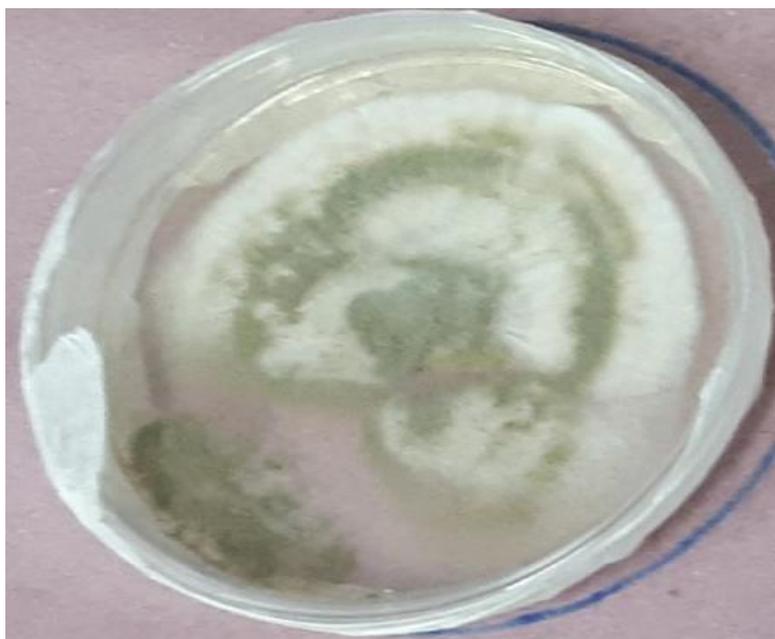
Macroscopicamente, a colônia de *Aspergillus* sp. NA01 em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose apresentou uma coloração branca na fase inicial de desenvolvimento, sendo que sua parte reprodutiva (conidióforos e conídios) apresentou uma massa de conídios amarelo esverdeado. Essa característica foi observada nos grupos controle de forma uniforme, porém nos meios contendo os inseticidas foi observada uma massa de conídios da mesma coloração, porém mais escasso (Figuras 09 e 10). Isto comprova que houve redução na diferenciação da parte vegetativa em reprodutiva.

**Figura 09:** Aspecto macroscópico da colônia de *Aspergillus* sp. NA01 no meio ágar-Sabouraud-dextrose (Grupo controle).



Fonte: Autor, 2020.

**Figura 10:** Aspecto macroscópico da colônia de *Aspergillus* sp. NA01 no meio ágar-Sabouraud-dextrose contendo o inseticida Malathion.



Fonte: Autor, 2020.

### 5.3. Análise da esporulação e viabilidade dos conídios de *Aspergillus* sp. NA01 produzidos nos meios de cultura contendo Fipronil, Malathion e Diazinon

A esporulação e viabilidade dos conídios foram testadas após raspagens na parte superior das colônias e os dados estão expressos na Tabela 02. Os três inseticidas testados apresentaram uma redução na esporulação e na viabilidade quando comparados com os grupos controles. Sendo essa redução mais expressiva observada no inseticida Malathion. Foi observado que os inseticidas Fipronil e Diazinon apresentaram uma viabilidade semelhante dos conídios, 54.10 % e 55.90 %, respectivamente. Já o Malathion apresentou uma redução bastante acentuada, possuindo apenas 23.67 % dos conídios viáveis.

**Tabela 02:** Efeito dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon sobre a esporulação e viabilidade dos conídios (%) de *Aspergillus* sp. NA01.

Tratamentos	Esporulação ( $1 \times 10^7$ conídios/mL) (%)	Viabilidade ( $1 \times 10^7$ conídios/mL) (%)
Controle negativo*	10.50 ± 0.18 a	92,35 ± 1,56 a
Controle positivo**	10.10 ± 2.11 a	95,57 ± 2,01 a
Fipronil	5,25 ± 1,93 b	54,10 ± 0,99 b
Malathion	2,90 ± 1,01 bc	23,67 ± 1,01 bc
Diazinon	5,55 ± 0,98 b	55,90 ± 0,94 b

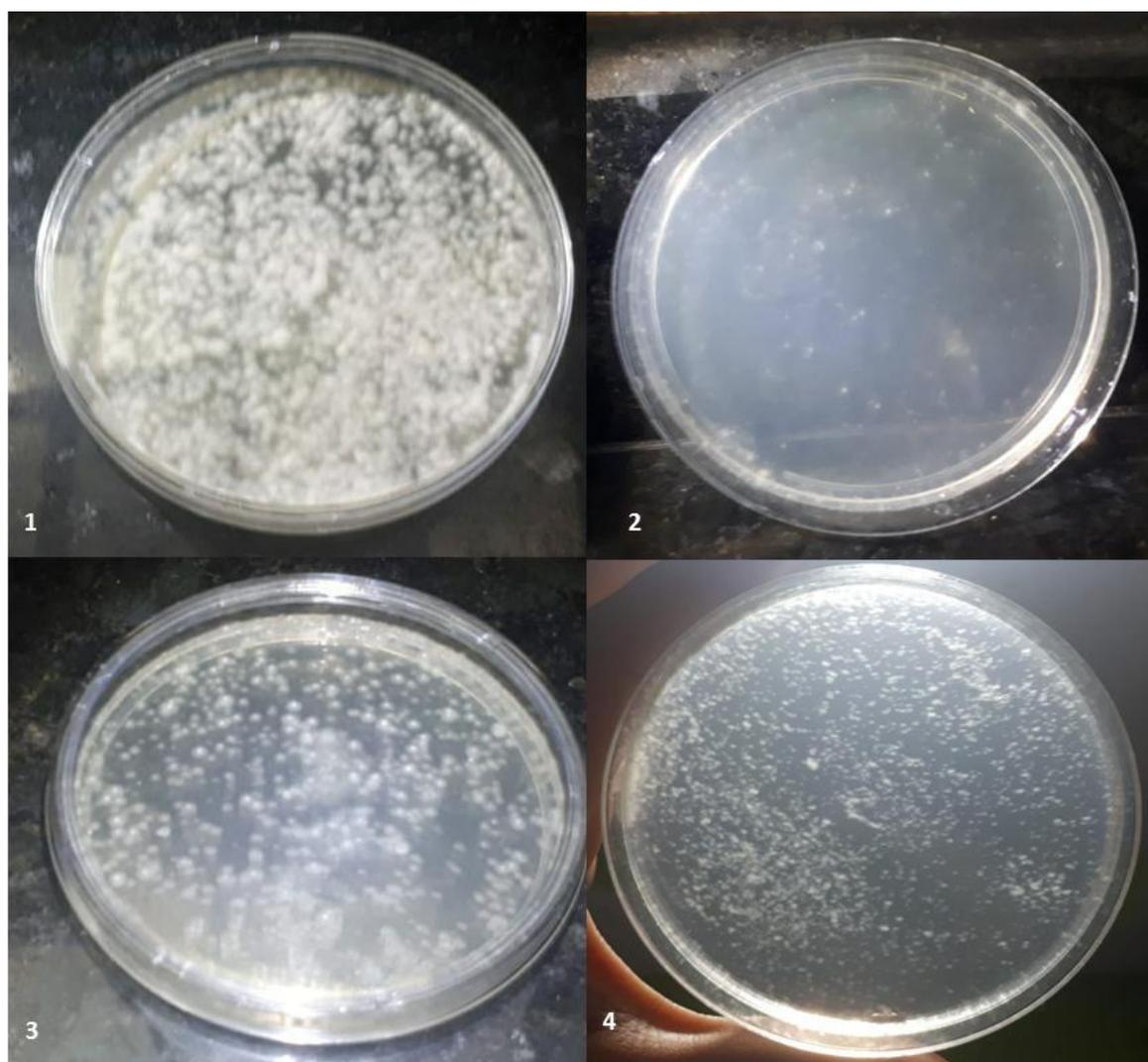
\*Controle negativo (meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose sem antibiótico mais o fungo), \*\*Controle positivo (meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose com antibiótico mais o fungo), Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de variação múltipla de Duncan (P<0,05).

O comportamento e viabilidade dos conídios de *Aspergillus* sp. NA01 produzidos no meio ágar-Sabouraud-dextrose contendo os três inseticidas estão expostos na Figura 11. As diferenças estatisticamente comprovadas na esporulação e na viabilidade dos conídios sugerem que os inseticidas, se forem aplicados no campo acima da concentração permitida, pode comprometer a viabilidade dos conídios. Esse comprometimento pode ocasionar redução na diferenciação morfológica da parte vegetativa do fungo em estruturas reprodutivas, com conseqüente redução da produção de conídios e germinação dos mesmos.

*Aspergillus* sp. é considerado um fungo eucárpico (ALEXOPOULOS et al., 1996). As estruturas reprodutivas surgem apenas em uma parte das estruturas somáticas, sendo a parte

restante, a forma vegetativa. O comportamento (crescimento e esporulação) é uma resposta à composição do meio de cultivo. No entanto, a variação na concentração de alguns nutrientes, pode justificar as diferentes respostas no desenvolvimento vegetativo *in vitro* do fungo, nos substratos contendo os inseticidas.

**Figura 11:** Viabilidade dos conídios de *Aspergillus* sp. NA01 produzidos no meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contendo inseticidas. 1 – Controle positivo; 2 – Malathion; 3 - Fipronil e 4 – Diazinon.



Fonte: Autor, 2020.

A esporulação e viabilidade dos conídios estão intimamente ligadas à disseminação do fungo em ambiente natural, já que os conídios não possuem uma forma de ir diretamente ao alvo, dependem de agentes como vento e água para que possam se espalhar no ambiente.

Sendo assim, para que o fungo consiga infectar propriamente os insetos alvo no manejo integrado de pragas, é necessário que apresentem uma boa esporulação e capacidade de germinação. Além disto, se faz necessária uma boa viabilidade dos conídios produzidos, já que os conídios que chegam a entrar em contato com o inseto precisam germinar para que haja o desenvolvimento e colonização na praga alvo (MORA, CASTILHO, FRAGA, 2018).

#### **5.4. Classificação quanto à compatibilidade *versus* toxicidade *in vitro*, do Fipronil, Malathion e Diazinon sobre *Aspergillus* sp. NA01**

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 03, os inseticidas Fipronil e Diazinon apresentaram valores de “T” acima de 60 (78 e 87, respectivamente), caracterizando-os como compatíveis ao fungo *Aspergillus* sp. NA01. Já o Malathion apresentou um valor de “T” igual a 15, classificando assim o inseticida como tóxico ao fungo.

**Tabela 03:** Classificação dos inseticidas Fipronil, Malathion e Diazinon quanto à toxicidade *in vitro* sobre de *Aspergillus* sp. NA01.

<b>Tratamentos</b>	<b>Valores de “T”</b>	<b>Classificação*</b>
<b>Fipronil</b>	78	Compatível
<b>Malathion</b>	15	Não Compatível
<b>Diazinon</b>	87	Compatível

\*Classificação em conformidade com Alves, 1998.

A avaliação de diferentes inseticidas e seus efeitos em diferentes fungos entomopatogênicos se faz indispensável para que se possa ter um melhor conhecimento de quais técnicas utilizar para o MIP de qualquer praga utilizando simultaneamente os inseticidas e os fungos. Tal importância se faz evidente quando se detecta o efeito negativo do inseticida com fungo, como evidenciado no presente estudo. O Malathion teve um impacto negativo no desenvolvimento do *Aspergillus* sp. NA01. Um estudo realizado por Pinto (2016) mostrou que isolados de *Metharizium anisopliae* demonstraram sensibilidade a diversos inseticidas testados, menos ao Malathion, que se mostrou compatível ao fungo.

Outro problema relacionado ao uso de inseticidas químicos como única forma de combate a pragas é o prejuízo às espécies locais inofensivas as lavouras, e em alguns casos,

prejudicando até espécies que realizam o controle natural das pragas, como aves e mamíferos. Tingle et al. (2003) mostra essa problemática abordando o fato de que diversas espécies de aves tiveram suas populações reduzidas em áreas onde inseticidas como o Malathion foram aplicados. Estes dados auxiliam a sustentar a ideia de que o MIP se faz necessário, pois o uso constante apenas do método químico de controle pode além de causar danos às populações de animais que naturalmente controlam a população da praga (LOCKWOOD et al, 1997), podem causar danos a fungos entomopatogênicos diminuindo seu potencial reprodutivo e a viabilidade de seus conídios, reduzindo assim, a taxa de virulência do fungo.

Apesar da toxicidade de alguns inseticidas com fungos entomopatogênicos, estudos mostram que a combinação de fungos e inseticidas pode trazer uma maior eficiência para o combate de pragas (QUINTELA; MCCOY, 1998). Um estudo feito por Ahmed et al. (2020), mostrou que o uso integrado de inseticidas com isolados de *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* causaram uma maior mortalidade do inseto praga, *Oxycarenum hyalinipennis*. Hiromori e Nishigaki (2001) demonstraram que *M. anisopliae* possui uma maior taxa de contaminação no inseto *Anomala cuprea* quando administrado em conjunto com inseticidas Fenitrothion.

Apesar de estudos comprovarem a eficiência do uso conjunto de fungos com os mais variados tipos de inseticidas, ainda se faz necessário o estudo da compatibilidade destes fungos com os respectivos inseticidas, para que se possa ter uma maior eficiência na implantação da técnica (AHMED et al., 2020) . No presente estudo, foi detectado que para o isolado *Aspergillus* sp. NA01, o Malathion não foi compatível, podendo levar a resultados nada satisfatórios se ambos forem usados em conjunto no campo. O estudo também revelou o resultado positivo da compatibilidade do fungo com os inseticidas Diazinon e Fipronil, abrindo assim, espaço para outros estudos de avaliação da atividade conjunta destes inseticidas com *Aspergillus* sp. NA01 para controle da *A. ipsilon*.

O inseticida Diazinon é um dos inseticidas mais utilizados na agricultura, inclusive no controle da lagarta-rosca. Contudo, estudos mostram que a sua utilização excessiva está ligada a sua presença tanto em águas de superfície quanto subterrâneas (SAEIDI, NAEIMI, KOMEILI, 2016). Tal contaminação tem gerado uma crescente preocupação com relação à intoxicação devido a seus efeitos adversos no organismo humano, envolvendo danos ao sistema nervoso e atividade enzimática (DEHGHANI et al, 2018). O estudo aqui presente mostra que o Diazinon é compatível com o fungo *Aspergillus* sp. NA01, sendo assim, o uso conjunto destes pode tanto ajudar a aumentar a eficiência do fungo, quanto diminuir a

quantidade de inseticida utilizado, minimizando assim os efeitos colaterais do uso do mesmo. Tal afirmação leva como base os estudos prévios realizados que comprovaram a eficiência de fungos entomopatogênicos combinados com inseticidas aplicados nas diferentes lavouras (QUINTELA; MCCOY, 1998; HIROMORI; NISHIGAKI, 2001; AHMED et al., 2020; VON NOWAKONSKI, 2014; GHOSH, PAL, 2015). Entretanto, o sucesso de programas de controle, utilizando fungos entomopatogênicos, depende da sobrevivência dos conídios no meio ambiente que pode ser alterada por fatores climáticos, biológicos ou por produtos químicos. A detecção de isolados compatíveis com compostos químicos de diferentes grupos é fundamental, pois o estabelecimento de enzootias, em populações de artrópodes a campo, só se estabelecerá se não houver inibição de crescimento vegetativo do agente entomopatogênico que é a etapa inicial do processo de controle (ALVES; MOINO JUNIOR; ALMEIDA, 1998).

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas condições estabelecidas e avaliadas neste estudo, conclui-se que dos três inseticidas testados, o Malathion apresentou uma toxicidade mais acentuada contra o fungo *Aspergillus* sp. NA01, levando em consideração os parâmetros de crescimento vegetativo, reprodutivo e viabilidade dos conídios. Os inseticidas Diazinon e Fipronil apresentaram redução no crescimento vegetativo e reprodutivo, mas foram considerados compatíveis com o isolado *Aspergillus* sp. NA01 *in vitro* e têm potencial para serem explorados no MIP para controle de *A. ipsilon*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL H., YASSER, et al. Immune-protective, antioxidant and relative genes expression impacts of  $\beta$ -glucan against fipronil toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & shellfish immunology, 94, p. 427-433, 2019.

ABDOLLAHI, M.; MOSTAFALOU, S.; POURNOURMOHAMMADI, S. et al. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 137, p.29-34, 2004.

AGROFIT. Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Acesso em 13 de novembro de 2020.

AHMED, K. et al. Efficacy of Entomopathogenic Fungi with Insecticides Mixtures against *Oxycarenus hyalinipennis* (Costa) (Lygaeidae: Hemiptera). Pakistan Journal of Zoology, 52, p. 573, 2020.

ALEXOPOULOS, C J; MIMS, C J; BLACKWELL, M. Introductory mycology. 4<sup>a</sup> ed. New York: Journal Wiley, p. 880, 1996.

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. BADI, MH.

ALVES, S. B.; MOINO A. JR.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. p. 217-238. In S. B. ALVES (ed.), Controle microbiano de insetos. São Paulo, Fealq, 1163 p. 1998.

ALYOKHIN, A.; BAKER, M.; MOTA-SANCHEZ, D.; DIVELY, G.; GRAFIUS, E. Colorado potato beetle resistance to insecticides. Am J Potato Res, 85, p.395–413, 2008.

BATISTA FILHO, A. et al. Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. Arquivos do Instituto Biológico, 70, p. 61-67, 2003.

BENTO, F. M. M.; MAGRO, S. R.; FORTES, P.; ZÉRIO, N. G.; PARRA, J. R. P. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Agrotis ipsilon* em dieta artificial. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 42, p. 1369-1372, 2007.

BINNING, R. R.; COATS, J.; KONG, X.; HELLMICH, R. L. Susceptibility to *Bt* proteins is not required for *Agrotis ipsilon* aversion to *Bt* maize. Pest Management Science. 71, p.601-606, 2015.

BURATTI, F. M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M. T. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. Drug Metab Dispos, 33, p. 295-302, 2004.

CAPINERA, J. Black Cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EDIS, v. 2007, n. 10, p. 5, 2007.

COSTA, F. D.; VERZELETTI, F. B.; WAGNER, R. Isolamento e identificação das aflatoxinas B1 e B2 de *Aspergillus parasiticus* em alimentos. Cadernos da Escola de Saúde, 11, p. 65-78, 2014.

DA MOTA A. R. et al. Manejo Integrado de Pragas na cultura da batata-doce. Cadernos de Agroecologia, v. 15, n. 2, 2020.

DEHGHANI, MOHAMMAD HADI et al. High-performance removal of diazinon pesticide from water using multi-walled carbon nanotubes. Microchemical Journal, v. 145, p. 486-491, 2019.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: Fealq, 2002. 920p.

GHOSH, S. K.; PAL, S. Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. Environmental Monitoring and Assessment, 188, 7 p, 2015.

HAJEK, ANN E.; DELALIBERA, Italo. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. BioControl, v. 55, n. 1, p. 147-158, 2010.

HIROMORI, H.; NISHIGAKI, J. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. Applied Entomology and Zoology, 36, p.231–236, 2001.

HUANES-CARRANZA, J; WILSON-KRUGG, J. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio. Rebiol, 36, p.51-58, 2016.

JOSHI, M. J. et al. Potato Cutworm, *Agrotis ipsilon*: An Overview and their Management. AGRICULTURE & FOOD: e-Newsletter, [S. l.], ano 2020, v. 2, p. 188-191, 1 maio 2020.

JUNIOR, J. C. L. Manejo integrado de pragas na cultura do tomate: uma estratégia para a redução do uso de agrotóxicos. Extensão em Foco (ISSN: 2317-9791), p. 6-22, 2019.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Annual Review of Entomology, 43, p. 243–270,1998.

KRITI, JAGBIR, SINGH; DAR, MUDASIR, A.; KHAN, Z. H. Biological and taxonomic study of agriculturally important noctuid pests of Kashmir. World Journal of Agricultural Research, 2, p. 82-87, 2014.

LOCKWOOD, J. A.; SCHELL, S. P.; ISU, N.; NORELIUS, E.; SCHELL, S. Field tests of fipronil: large scale evaluations of fipronil and small scale evaluations of RPA 107382 for control of rangeland grasshoppers in Wyoming (USA), with implications for reduced agent! area treatments. Report to Rhône-Poulenc. University of Wyoming, Laramie, USA. 89 p, 1997.

MAGALHAES, L. C.; HUNT, T.E.; SIEGFRIED, B. D. Efficacy of neonicotinoid seed treatments to reduce soybean aphid populations under field and controlled conditions in Nebraska. *J Econ Entomol* 102, p.187–195, 2009.

MANTZOUKAS, SPIRIDON; ELIOPOULOS, PANAGIOTIS A. Endophytic Entomopathogenic Fungi: A Valuable Biological Control Tool against Plant Pests. *Applied Sciences*, v. 10, n. 1, p. 360, 2020.

MINAS, R. S.; OLIVEIRA, C. M. R.; SANTOS, V. P.; LIMA, V. L. S.; PIROVANI, V. D. Lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), p. 75-89. In: MINAS, R. S. (Org.). Solanáceas: abordagem das principais culturas e suas pragas. Brasília: Kiron, 2013.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84, p 1-10, 2018.

MUNIB, MOHAMMAD. Severity of infestation by collar feeding insect pest (*Agrotis ipsilon*) on potato in northern districts of Kashmir. *Journal of Eco-friendly Agriculture*, 13, p. 72-74, 2018.

NAKANO, O. *Entomologia Econômica*. Piracicaba: ESALQ/USP, 2011. 464 p.

PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F. J.; ST. LEGER, R. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. *Microbiology*, 157, p.47-55, 2011.

PINTO, A. P. F. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). 83f. Tese (Doutorado) Programa de pós- graduação, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas. Botucatu, 2016.

PURWAR, J. P.; SACHAN, G. C. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against bihar hairy caterpillar, *Spilarctia oblique* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiol. Res.*, 161, p.38- 42, 2006.

QUINTELA, E. D.; MCCOY, C. W. Synergistic effect of imidacloprid and two entomogenous fungi on behaviour and survival of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *J. econ. Ent.*, 91: p.110-122, 1998.

RASHID, M.; GARJAN, A. S.; NASERI, B.; GHAZAVI, M.; BARARI, H. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with the insecticides fipronil, pyriproxyfen and hexaflumuron. *Journal of Entomological Society of Iran*, 31, p.29-37, 2012.

ROSSI-ZALAF, L. S.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; SILVEIRA, N. S.; TANZINI, M. R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: *Controle Microbiano de Pragas na América latina: Avanços e Desafios*. FEALQ, Piracicaba, pp. 279- 302. 2008.

SAEIDI, M.; NAEIMI, A.; KOMEILI M. Magnetite nanoparticles coated with methoxy polyethylene glycol as an efficient adsorbent of diazinon pesticide from water. *Vacuum*. 16, p.17, 2016.

SAMS, C.; COCKER, J.; LENNARD, M. S. Metabolism of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes. *Toxicology Letters*, 144, p.146–153, 2003.

SEYE, F.; BAWIN, T.; BOUKRAA, S.; ZIMMER, J.-Y.; NDIAYE, M.; DELVIGNE, F.; FRANCIS, F. Effect of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 49, p.453–458, 2014.

SEYE, F.; BAWIN, T.; BOUKRAA, S.; ZIMMER, J.; NDIAYE, M.; DELVIGNE, F.; FRANCIS, F. Pathogenicity of *Aspergillus clavatus* produced in a fungal biofilm bioreactor toward *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Pesticide Science*, 39, p.127–132, 2014.

SHAH, M. D.; IQBAL, M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, p.3345–3353, 2010.

SHOWERS, W. B. Migratory ecology of the black cutworm. *Annual Review of Entomology*, 42, p.393–425, 1997.

SIMON-DELISO, N. O. A. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, p. 5–34, 2015.

SRIVASTARA, N.; MAURYA, P.; SHARMA, P.; MOHAN, L. Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomology Research*, 39, p.341–355, 2009.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 5, p.1–66, 2003.

VEGA, F. E.; MEYLING, N.; LUANGSA-ARD, J.; BLACKWELL, M. Fungal Entomopathogens. *Insect Pathology*, 4, p.171–220, 2012.

VIDAU, C.; GONZÁLEZ-POLO, R. A.; NISO-SANTANO, M.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, R.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; PIZARRO-ESTRELLA, E.; FUENTES, J. M. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *NeuroToxicology*, 32, p.935–943, 2011.

VON NOWAKONSKI, ERIKA. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1903 (Hemiptera: Aleyrodidae) e Compatibilidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros. 2019. 73 p. Tese (Mestrado) - Instituto Biológico, Campinas, 2019. Disponível em: <http://repositoriobiologico.com.br/jspui/handle/123456789/109>. Acesso em: 14 nov. 2020.

XU, CHUNMEI et al. Effects of sublethal concentrations of cyantraniliprole on the development, fecundity and nutritional physiology of the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, 11, p. 156–555, 2016.