

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA

**ASPECTOS SINTOMATOLÓGICOS DA INTERAÇÃO DIPEL® E
CÉLULAS DO EPITÉLIO DO INTESTINO MÉDIO DE *Brassolis
sophorae* L., (1758) (Lepidoptera, Nymphalidae) EM PALMA DE
ÓLEO.**

Nilson Veloso Bezerra

Biomédico

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA

**ASPECTOS SINTOMATOLÓGICOS DA INTERAÇÃO DIPEL® E
CÉLULAS DO EPITÉLIO DO INTESTINO MÉDIO DE *Brassolis
sophorae* L., (1758) (Lepidoptera, Nymphalidae) EM PALMA DE
ÓLEO.**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola)

Doutorando: Nilson Veloso Bezerra

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Bezerra, Nilson Veloso

B574a Aspectos sintomatológicos da interação entre Dipel® e células do epitélio do intestino médio de *Brassolis sophorae* L., (1758) (Lepidoptera Nymphalidae) em palma de óleo / Nilson Veloso Bezerra. – – Jaboticabal 2016

iii, 40 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Ricardo Antônio Polanczyk

Banca examinadora: Luis Garrigós Leite, Sérgio Antônio de Bortoli Arlindo Boiça Júnior, José Roberto Scarpellini.

Bibliografia

1. Entomologia. 2. Histologia. 3. *Bacillus thuringiensis*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.78:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ASPECTOS SINTOMATOLÓGICOS DA INTERAÇÃO DE DIPEL® E
Brassolis sophorae L., (1758) (LEPIDOPTERA, NYMPHALYDAE)
EM PALMA DE ÓLEO

AUTOR: NILSON VELOSO BEZERRA

ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

DR. LUIS GARRIGÓS LEITE
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico / CEIB - Campinas, SP

Pesquisador JOSE ROBERTO SCARPELLINI
APTA / REGIONAL CENTRO LESTE - Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 02 de junho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nilson Veloso Bezerra, biomédico, formado pela Universidade Federal do Pará, especialista em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela Universidade Federal do Pará, MBA em Administração Hospitalar pela FACINTER e Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Pará, professor de Microbiologia na Universidade do Estado do Pará e biomédico responsável pelo Controle de Qualidade no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Ophir Loiola.

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha”

Confúcio

À minha família,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de todo saber e conhecimento, meus pais Milton Braga Bezerra (em memória) e Amélia Veloso Bezerra, pela vida e pelos preceitos morais, a minha esposa Layne pela compreensão, pelo amor e seu imensurável apoio, a meus filhos Nilson Junior, Juliane, Vinicius e Arthur, amores de minha vida, ao Professor Paulo Farias, grande incentivador deste projeto, ao Professor Ricardo Polanczyk pela orientação deste trabalho, aos colegas do DINTER, em especial ao amigo Javier e a amiga Patricia, aos acadêmicos de agronomia Camila e Tiago, estagiários do Laboratório de Entomologia Aplicada da UFRA pela ajuda na classificação das lagartas, a empresa AGROPALMA e a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

PÁGINA

Resumo	ii
Abstract	iii
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 - Características gerais da cultura de palma de óleo	03
2.2 – Biologia da <i>Brassolis sophorae</i>	05
2.3 - Medidas para o controle de insetos pragas da palma de óleo.....	06
2.3 - Características gerais do <i>Bacillus thuringiensis</i>	07
2.4 - Características do epitélio do intestino médio de <i>B. sophorae</i>	09
2.5 - Modo de ação das proteínas Cry	11
2.6 - Características do Dipel®	14
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 - Obtenção do inseto-praga	15
3.2 – Bioensaios	15
3.3 - Preparação de peças histológicas	16
3.4 - Análise estatística	18
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5 – CONCLUSÕES	28
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

ASPECTOS SINTOMATOLÓGICOS DA INTERAÇÃO ENTRE DIPEL® E CÉLULAS DO EPITÉLIO DO INTESTINO MÉDIO DE *Brassolis sophorae* L., (1758) (Lepidoptera, Nymphalidae) EM PALMA DE ÓLEO.

RESUMO - Objetivou-se avaliar a ação do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) no epitélio do intestino médio de lagartas de *Brassolis sophorae* L. (Linnaeus). O trabalho foi realizado no período de janeiro a novembro de 2015 no Laboratório de Entomologia Agrícola Aplicada da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém-PA. As lagartas foram coletadas na plantação de palma de óleo da empresa Companhia Reais Agroindustriais, pertencente ao Grupo AGROPALMA, localizada no km 70 da Rodovia PA-150, Município de Tailândia, Pará (Latitude: 2° 38' S. Longitude: 48° 13' W. Gr.). Aplicou-se formulação comercial Dipel® de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* por meio de imersão de folhas de palma de óleo, previamente lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente, as quais foram incorporadas à dieta fornecida às lagartas de terceiro instar de *B. sophorae* mantidas em recipientes plásticos. A aplicação do bioinseticida por meio da imersão das folhas de palma de óleo mostrou-se eficiente no controle de lagartas, atingindo níveis de 100% de mortalidade em todas as concentrações utilizadas (0,25; 0,5; 0,75 e 1,00 L/ha) variando para menos o tempo de efetividade de acordo com o aumento da concentração. Sintomas de infecção pelo *B. thuringiensis* foram identificados nas lagartas e confirmadas através da observação microscópica de alterações morfológicas e formação de vacúolos no citoplasma das células epiteliais do intestino médio das lagartas. A utilização do Dipel® nessas concentrações ocasionou efeito citotóxico local, produzindo histólise no intestino médio de lagartas de *B. sophorae*, levando, provavelmente, ao funcionamento anormal desse tecido, alterando a secreção de enzimas, a absorção dos nutrientes e a renovação celular e consequentemente a morte.

Palavras chave: Palma de óleo, *Brassolis sophorae*, *Bacillus thuringiensis*

SYMPTOMATOLOGY ASPECTS OF INTERACTION BETWEEN DIPEL® AND MIDGUT EPITHELIUM CELLS OF *Brassolis sophorae* L., (1758) (Lepidoptera, Nymphalidae) IN OIL PALM.

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the action of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) in the midgut epithelium crawler *Brassolis sophorae* L. (Linnaeus). The work was carried out from January to November 2015 in Applied Agricultural Entomology Laboratory of the Federal Rural University of Amazonia (UFRA), Belém-PA. Larvae were collected in the oil palm plantation company Royal Agroindustrial company belonging to AGROPALMA Group, located at kilometer 70 of Highway PA-150, City of Thailand, Pará (Latitude: 2° 38 'S. Longitude: 48° 13' W. Gr.). applied Dipel® commercial formulation of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* by dipping palm leaf oil, previously washed with distilled water and dried in room temperature water, which were incorporated into the diet fed to third instar larvae of *B. sophorae* kept in plastic containers. The application of the biopesticide by immersing the oil palm leaves was efficient in the control of caterpillars, reaching levels of 100% mortality in all used concentrations (0.25, 0.5, 0.75 and 1, 00 L / ha) for less time varying effectiveness according to the concentration. Symptoms of infection with *B. thuringiensis* were identified in the caterpillars and confirmed by microscopic observation of morphological changes and vacuole formation in the cytoplasm of epithelial midgut cells of caterpillars. The use of these concentrations resulted Dipel® location cytotoxic effect, producing histolysis in the midgut of track *B. sophorae* leading probably abnormal operating this tissue, altering enzyme secretion, absorption of nutrients and cellular renewal and thus the death.

Keywords: oil palm, *Brassolis sophorae*, *Bacillus thuringiensis*.

1 – INTRODUÇÃO

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira nativa da África ocidental e introduzida no Brasil, inicialmente, no Estado da Bahia, no fim do século XVI e depois na região amazônica onde, atualmente, estão as maiores áreas cultivadas (VENTURIERI et al., 2009). De tronco anelado e ereto, esta palmeira pode chegar até 15 metros de altura, se desenvolve normalmente em regiões de clima tropical úmido e apresenta como principal produto o óleo extraído da polpa do fruto, conhecido internacionalmente como “palm oil” ou palma de óleo (CARVALHO, 2009).

Destaca-se pela alta rentabilidade, geração de emprego, fixação do homem ao campo e redução de impactos ambientais além de ser uma fonte de óleo vegetal presente em quase metade de produtos alimentícios, produtos de limpeza e cosméticos, o óleo de palma é o segundo óleo vegetal mais consumido do mundo, perdendo apenas para a soja (ABDALLA et al 2008).

Sua produção de óleo foi superior a 50 milhões de toneladas no ano de 2012, em aproximadamente 15 milhões de hectares plantados, superando a produção mundial de óleo de soja que não alcançou 42 milhões de toneladas (FAO, 2013), consagrando a cultura da palma como a principal fonte mundial de óleo vegetal.

O estado do Pará é o maior produtor brasileiro de óleo de palma, sendo esta cultura a de maior importância econômica e seu impacto social é de extrema importância para os habitantes da zona rural do estado (AGRIANUAL, 2014).

Entre os fatores limitantes à produção desta planta destacam-se os insetos, e entre as espécies-praga da palma de óleo destaca-se, entre outras, a lagarta desfolhadora *Brassolis sophorae* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), que apresenta elevado potencial de consumo foliar, podendo provocar danos significativos a esses cultivos em função de prejudicar o desenvolvimento e a produção das plantas atacadas (SAENZ & OLIVARES, 2008).

O controle de insetos, nocivos a agricultura ou vetores de doenças, é feito na maioria das vezes, por produtos químicos (ESTRUCH, 1997, SILVA-FILHO e FALCO, 2000), o efeito deletério dos inseticidas convencionais no meio ambiente e o aumento dos relatos de resistência de populações de insetos a moléculas químicas levou à concepção do Manejo Integrado de Pragas (MIP), destacando-se, entre os métodos, o controle biológico devido a sua alta eficiência, menor risco ao meio ambiente e à saúde

humana e pelo menor custo de produção (BREWER e GOODELL, 2012; PANIZZI, 2013).

A eficácia e especificidade das cepas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e suas toxinas no controle biológico de insetos praga, favoreceram a formulação de bioinseticidas a partir deste patógeno e 322 produtos à base de *Bt* são responsáveis por 53% do mercado mundial de bioinseticidas, gerando um faturamento anual de US\$ 210 milhões (CAB INTERNACIONAL CENTRE, 2010).

No Brasil, estes bioinseticidas ainda são pouco utilizados para controle de pragas, porém com grandes possibilidades de crescimento, diante do enorme potencial agrícola brasileiro. O uso destes produtos no mercado nacional ainda esbarra em algumas dificuldades, tendo como principais limitações o elevado custo destes produtos no mercado nacional, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores públicos e privados no desenvolvimento na formulação destes produtos (POLANCZYK & ALVES, 2003; POLANCZYK et al., 2012).

O Dipel® é um bioinseticida que tem como ingrediente ativo o *B. thuringiensis kurstaki*, é um produto utilizado mundialmente no controle de lepidópteros (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000; CAB INTERNACIONAL CENTRE, 2010; BRAVO et al., 2011), sendo este o produto de maior penetração no mercado brasileiro (POLANCZYK et al., 2012).

O aprofundamento do conhecimento da ação desta bactéria no organismo da lagarta *B. sophorae* e dos danos causados pela interação dos produtos bacterianos e as células do epitélio do seu intestino médio é de fundamental importância para fomentar novas pesquisas que visem o desenvolvimento de novos produtos biológicos para o controle desta praga.

Este trabalho buscou avaliar a ação do *B. thuringiensis kurstaki*, através do uso de Dipel®, em diferentes concentrações, desencadeada em células do intestino médio de lagartas de *B. sophorae* para verificar o grau de toxicidade e o tipo de agravos que as toxinas Cry determinam neste epitélio, observando o desenvolvimento da doença e mortalidade causada pelo produto, além da observação das alterações de comportamento das lagartas e dos aspectos morfológicas das células do intestino médio.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Características gerais da cultura de palma de óleo

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira nativa da África ocidental e introduzida no Brasil, inicialmente, no Estado da Bahia, no fim do século XVI e depois na região amazônica onde, atualmente, estão as maiores áreas cultivadas (VENTURIERI et al., 2009).

De tronco anelado e ereto, esta palmeira pode chegar até 15 metros de altura, se desenvolve normalmente em regiões de clima tropical úmido e apresenta como principal produto o óleo extraído da polpa do fruto, conhecido internacionalmente como “palm oil” ou óleo de palma (VEIGA et al., 2001; CARVALHO, 2009).

O gênero *Elaeis*, subtribo Elaeidae, tribo Cocoinae, subfamília Cocoidae, família Arecaceae (antes Palmaceae) e ordem Palmales, foi descrito em 1763 por Nicholas Joseph Jacquin ao escrever sobre palmeiras introduzidas na Ilha de Martinica, denominando *E. guineensis*. O termo *Elaeis* deriva da palavra grega “elaion”, que significa óleo, e *guineensis* pelo classificador ter atribuído sua origem à Costa de Guiné, na África (BAILEY, 1933; HARTLEY, 1977; EMBRAPA, 2012).

O cultivo de palma do óleo é considerado a principal atividade agroindustrial em regiões tropicais úmidas semelhantes à Amazônia, como a Malásia, a Indonésia, o Equador, a Colômbia e alguns países africanos. A planta é perene e de vida útil econômica entre 25 e 30 anos e se caracteriza como um importante oleaginoso. Esta cultura apresenta excelente adaptação às condições edafoclimáticas da Amazônia que dispõe da maior área do mundo para a sua expansão (BASTOS et al., 2001; FRANQUEVILLE, 2003; CHIA et al., 2009).

A cultura de palma do óleo se destaca na agricultura mundial por possuir elevada produção de óleo por unidade de área, alcançando uma produtividade média de 4 a 5 toneladas de óleo por hectare/ano (MOURA, 2008).

No Brasil, as maiores parcelas de cultivo estão situadas na região amazônica com mais de 60.000 hectares, sendo o Estado do Pará o maior produtor brasileiro, tanto do azeite de palma, quanto do óleo de palmiste, sendo responsável por mais de 80% da produção nacional (CARVALHO; BALDANI; REIS, 2001; AGRIANUAL, 2014), porém um fator importante que pode comprometer sua produtividade é a ocorrência de insetos-praga, destacando-se a ocorrência de lagartas desfolhadoras (CHIA et al., 2009).

Os insetos têm sido uma das maiores causas de danos na produção de alimentos, sendo estas perdas da ordem de 15 a 30% da produção mundial, o controle de insetos, nocivos a agricultura ou vetores de doenças, é feito hoje, na maioria das vezes, por produtos químicos (ESTRUCH, 1997; SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

Estes produtos, embora de grande importância no controle de pragas, são frequentemente empregados sem orientação técnica ou de forma abusiva, podendo determinar alguns efeitos adversos, tais como alterações no ecossistema, intoxicação de agricultores e seus familiares e ainda podem permanecer de forma residual em alimentos consumidos “in natura” (ALVES, 1998; COSTA et al., 2006; FARIA et al., 2007; ANVISA, 2013).

Culturas agrícolas com resíduos acima do LMR (Limite Máximo de Resíduo) ou a presença de agrotóxicos em culturas para as quais seu uso não é autorizado demandam a utilização dos resultados do Programa de Análise de Resíduo de Inseticidas em Alimentos (PARA) para a avaliação do risco dietético o que pode determinar a inadequação do alimento ao consumo (ANVISA, 2014).

Entre as principais pragas de palma de óleo destacam-se as lagartas desfolhadoras *Brassolis* spp. e *Opsiphanes* spp. (Lepidoptera: Nymphalidae), *Sibine* spp. e *Talima* spp. (Lepidoptera: Limacodidae), *Euprosterina* sp. e *Automeris* spp. (Lepidoptera: Saturniidae) que apresentam elevado potencial de consumo foliar podendo provocar danos significativos à produção das plantas, em um ataque generalizado de uma praga desfolhadora como a *Brassolis* spp. a infestação pode acarretar perdas de cerca de 50% do rendimento da planta e a recuperação total de uma área fortemente desfolhada pode levar vários anos (COSTA, 1973; WOOD, 1973; REYES e CRUZ, 1986, SASAERILA et al., 2000; TINOCO, 2008).

As principais estratégias de controle das pragas de palma de óleo no Brasil são direcionadas para programas de manejo integrado de pragas (MIP), realizando técnicas como a manipulação de cultivares e o controle cultural (PARRA et al., 2009) ou o controle biológico por parasitoides, predadores e entomopatógenos (RIBEIRO et al., 2010).

A espécie *B. sophorae* é uma das pragas desfolhadoras mais comumente encontrada em palmeiras ornamentais, alimentícias ou de caráter industrial (ZORZENON, 2008; LEMOS e BOARI, 2010). Esta praga é encontrada em quase todos os países tropicais da América do Sul sendo relatada no Brasil, nos Estados do

Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo e Distrito Federal e Sergipe (FERREIRA e LEAL, 1989; BRISTOW, 2008).

2.2 – Biologia da *Brassolis sophorae*

As lagartas de *B. sophorae* são considerados pragas de diferentes palmeiras cultivadas, as fêmeas depositam ovos em grupos, que variam de 100 a 150 na parte superior da estirpe, na base do pecíolo foliar e nos folíolos (BONETTI FILHO, 1993; VILELA e MOURA, 1998; GALLO et al., 2002; LEMOS e BOARI, 2010).

As lagartas dessa espécie são de grande importância para cultura de palma de óleo, elas consomem grande quantidade de área foliar, consumindo em altas infestações cerca de 80% das folhas da planta, deixando somente as nervuras centrais dos folíolos e da ráquila, podendo determinar atraso no desenvolvimento da planta, a queda prematura dos frutos e a redução da produção, ou ainda, em ataques mais intensos, a morte da planta (ZEDDAM et al., 2003; BRISTOW, 2008).

O adulto é uma borboleta de tamanho médio, de hábito crepuscular, com aproximadamente 70,0 a 80,0 mm de envergadura para os machos e 90,0 a 105,0 mm de envergadura para as fêmeas. As asas anteriores e posteriores são de coloração castanha-violácea com faixas alaranjadas junto às bordas externas em sua face dorsal castanha-clara com três pequenas manchas circulares (ocelos), presentes em cada uma das asas posteriores, em sua face ventral (GALLO et al., 2002; ZORZENOM, 2008).

As manchas alaranjadas nas asas anteriores apresentam-se bifurcadas nas fêmeas no formato da letra Y e sem bifurcação nos machos. As posturas são realizadas em grupos de aproximadamente 100 ovos, depositadas nas próprias folhas, os ovos são de aspecto cilíndrico, inicialmente branco-amarelados e, posteriormente, tornando-se rosados e cinzas quando próximo à eclosão das lagartas. As lagartas nascem após um período de 20 a 25 dias e podem chegar a 80 mm de comprimento em seu último estágio de desenvolvimento (GALLO et al., 2002; ZORZENOM, 2008).

No início do desenvolvimento, possui coloração bastante vistosa, com cabeça de coloração vermelho vivo, corpo esverdeado de pilosidade clara, com listras longitudinais arroxeadas muito evidentes. Em seus últimos estádios de

desenvolvimento, a cabeça passa a ser de coloração menos intensa variando de marrom-avermelhada a marrom escura com lista longitudinal avermelhada e corpo pardo-arroxeadado com listras longitudinais castanhas, recobertas por fina pilosidade. Não possuem ornamentações cefálicas e apêndice bifurcado na parte final do corpo, geralmente presentes nos representantes da subfamília Brassolinae a que pertencem (LEMOS e BOARI, 2010).

. As lagartas são gregárias, passam por seis estádios de desenvolvimento, com ciclo variando entre 50 a 90 dias. Vivem reunidas durante o dia em “casulos” ou “ninhos” feitos da união de folíolos e seda, servindo de abrigo contra predadores e intempéries. As lagartas abrigam-se nesses “ninhos” e os deixam no início da noite para se alimentarem das folhas da planta hospedeira. Podem também abrigar-se junto às axilas das folhas e espatas das inflorescências (BONETTI FILHO, 1993; VILELA e MOURA, 1998; GALLO et al., 2002; LEMOS e BOARI, 2010).

Observa-se frequentemente que lagartas provenientes de posturas diferentes se agregam em “ninhos” comuns, encontrando-se 350 indivíduos ou mais de diferentes estádios em um único “ninho” (observação pessoal). Próximo à pupação, as lagartas caminham ativamente pela planta hospedeira e adjacências fixando-se pelo cremaster (extremidade posterior) e transformando-se em pupa, permanecendo por 11 a 15 dias até a emergência do adulto. O ciclo completo de ovo a adulto dá-se em torno de 80 a 125 dias (GALLO et al., 2002; ZORZENOM, 2008).

2.3 - Medidas para o controle de insetos pragas da palma de óleo

O controle de pragas na agricultura resulta no aumento do custo de produção, trazendo problemas tanto para o produtor quanto para o consumidor e para o ambiente (GITAU et al., 2009).

O custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e tem aumentado ao longo dos anos devido à necessidade de novas moléculas e formulações mais adequadas, além disso, existem poucas formulações químicas específicas disponíveis para uso em palma de óleo, atualmente, existe o inseticida químico lufeniurum e produtos biológicos à base de *B. thuringiensis* registrados para controle de *B. sophorae* em palma de óleo ou outras palmáceas (MAPA, 2013), tal situação tem feito crescer o

interesse por inseticidas alternativos, como os bioinseticidas os quais são mais específicos e menos poluentes (SCHNEPF et al., 1998; VAN LENTEREN, 2000; ALMEIDA e BATISTA FILHO, 2001).

O controle de *B. sophorae* na cultura de palma de óleo em campo é realizado principalmente através de dois métodos, o método mecânico, realizado por meio da coleta e destruição de ninhos e lagartas. Este método requer profissionais treinados e capacitados a visualizar e reconhecer ninhos e plantas atacadas, sendo a técnica dificultada principalmente em grandes plantações nas quais o profissional precisa percorrer uma área muito extensa de busca.

O outro método é o biológico, o qual é realizado empregando-se entomopatógenos, como a bactéria *B. thuringiensis* (Berliner) e fungos dos gêneros *Beauveria* (Baes) onde suas formulações são pulverizadas diretamente nos ninhos que abrigam as lagartas, sendo sua eficiência avaliada pela ocorrência de morte e redução de ninhos, este método de controle é mais aplicado na cultura de palma de óleo destinada a produção de alimentos (TINOCO, 2008).

As diversas vantagens do controle biológico em relação ao químico estão relacionadas com a redução de intoxicações de agricultores provocados pelo uso inadequado de inseticidas convencionais, menor impacto no ambiente e na preservação da qualidade da água dos afluentes próximos a plantação (ROH et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010).

2.4 – Características gerais do *Bacillus thuringiensis* (Bt)

O *B. thuringiensis* foi citado pela primeira vez por Ishiwata (1901), no Japão, causando mortalidade no bicho-da-seda *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae). Em 1915, na Alemanha, Berliner descreveu a bactéria formadora de esporos com o nome de *B. thuringiensis*, após ter registrado sua ocorrência infectando a traça-das-farinhas *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae).

O Bt é um bacilo gram-positivo presente em solos nos mais diversos continentes, trata-se de uma bactéria aeróbica, isto é, necessita de oxigênio para sobreviver e, quando as condições ambientais se tornam adversas, por exemplo, na ausência de oxigênio, pode esporular para manter-se viável nestas condições (BUCHANAN e GIBBON, 1974; PEFEROEN, 1997; AZAMBUJA et al., 2009; ABOUSSAID et al., 2011;

PRABHAKAR e BISHOP, 2011; PATEL et al., 2013; SWIECICKA et al., 2013; ARGÔLO-FILHO e LOGUERCIO, 2014).

Esta bactéria é bem conhecida pela sua habilidade de produzir, durante a fase de esporulação, inclusões cristalinas proteicas chamadas de proteínas cristal ou, como são mais conhecidas, proteínas Cry, que têm atraído atenção de pesquisadores em todo mundo devido a sua atividade inseticida (SCHNEPF et al., 1998; SIEGEL, 2001; POLANCZYK & ALVES, 2003).

Desde a sua descoberta e avaliado seu potencial de ação no controle de insetos, os estudos sobre a clonagem e sequenciamento dos genes das proteínas Cry vem crescendo, buscando caracterizar e classificar essas proteínas de acordo com a nomenclatura estabelecida por Crickmore et al. (1998).

A produção de cristais proteicos representa uma característica típica do *Bt* e estes cristais apresentam atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos (SCHNEPF et al., 1998; BRAR et al., 2006; Van FRANKENHUYZEN, 2013; SCHÜNEMANN et al., 2014), a maioria dos genes codificadores de proteínas Cry está localizada em grandes plasmídeos, sendo que alguns dos isolados de *Bt* contêm mais de um gene de proteínas Cry (KRONSTAD et al., 1983).

A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos, um deles dependente dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde estão classificados a maioria dos genes *cry*, e o outro, independente do processo de esporulação, como os genes *VIP*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo da bactéria (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

As pró-toxinas produzidas assumem formas distintas evidenciadas através do estudo morfológico realizado por microscopia eletrônica, apresentando cristais bi piramidais, cuboides, piramidais e esféricos. A forma apresentada pelo cristal pode fornecer indicações sobre a atividade tóxica e, conseqüentemente, a ligação dessa toxicidade aos diferentes tipos de genes codificadores de proteína cristal efetivos contra vários insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (DE MAAGD et al., 2003; BOMSERM et al., 2005; Van FRANKENHUYZEN, 2013).

O espectro de ação de diferentes isolados de *Bt* depende da combinação das proteínas Cry individuais presentes no cristal (ESTRUCH, 1997) e a toxicidade das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991), enquanto o

esporo, que representa a forma de resistência da bactéria, pode sobreviver durante vários anos; a durabilidade dos cristais é altamente variável, dependendo das condições ambientais (HÖFTE e WHITELEY, 1989).

Diversas proteínas que atuam em diferentes ordens de insetos já foram descritas, são mais de 50 diferentes famílias descobertas e organizadas por um código numérico. Como exemplo tem-se a família Cry1, que atua sobre lepidópteros, a Cry3 que atua sobre coleópteros e a Cry4 que atua sobre dípteros inclusive utilizada no controle biológico de mosquitos vetores de doenças como a dengue (CRICKMORE, 2001; SILVA, 2008).

Bioinseticidas à base de *Bt* são utilizados com sucesso no controle de pragas desde a segunda metade do século XX (ROSAS-GARCIA, 2009; SANAHUJA et al., 2011; SANCHIS, 2011; POLANCZYK et al., 2012). Esta bactéria entomopatogênica tem efeito letal e/ou sub letal na fase jovem e/ou adulta de diversas ordens de insetos de importância agrícola como Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera e Orthoptera (PORCAR et al., 2009; Van FRANKENHUYZEN, 2009; ABOUSSAID et al., 2010; BLANCO et al., 2010; OPPERT et al., 2011; BRAVO et al., 2012; BERGAMASCO et al., 2013; PANIZI, 2013; Van FRANKENHUYZEN, 2013; ZHANG et al., 2013, SCHÜNEMANN et al., 2014).

O bioinseticida à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (*Bt kurstaki* HD-1). Este produto, apesar de ser pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é considerado altamente eficiente contra mais de 170 lepidópteros praga (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

2.5 – Características do epitélio do intestino médio de *B. sophorae*

As toxinas de *Bt* agem ligando-se a sítios-alvo específicos na membrana epitelial do intestino médio do inseto, sendo este segmento responsável pela absorção de produtos da digestão e produção de enzimas digestivas (TERRA, 1996; LOEB et al., 2001; SERRÃO et al., 2004; JARIAL, 2005), o qual consiste de um tubo de diâmetro variável formado por um epitélio simples apoiado sobre uma membrana basal (CHAPMAN, 1998).

A parede do intestino médio é composta por epitélio de revestimento simples e por duas camadas musculares, a circular interna e longitudinal externa (NEVES et al., 2002). Segundo Cavalcante e Cruz-Landim (1999) e Pinheiro et al. (2010), no epitélio

do intestino médio dos insetos há predominância de quatro tipos de células: células colunares, células caliciformes, células regenerativas e células endócrinas. Essas células predominaram ao longo do epitélio do intestino médio das lagartas de *B. sophorae*, as quais são consideradas responsáveis pela absorção do alimento digerido, mostrando aspectos morfológicos similares a outros lepidópteros (CAVALCANTE e CRUZ-LANDIM 1999, LEVY et al 2004).

Conforme estudos de Harper & Hopkins (1997) e Harper & Granados (1999), essas células epiteliais, também são responsáveis pela secreção de uma malha de microfibrilas de quitina embebidas em uma matriz de proteínas e glicoproteínas denominada de membrana peritrófica, que exerce várias funções, tais como: proteção do epitélio contra danos mecânicos e químicos provocados pelo alimento, barreira física contra microrganismos e compartimentalização da digestão (MARTINS et al 2006).

As células caliciformes observadas em *B. sophorae* são similares às de outros lepidópteros, apresentando cavidade típica, denominada de câmara globosa, as quais estão distribuídas por todo epitélio do intestino médio e intercaladas por células colunares, essas células têm como função principal realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, mantendo a homeostase iônica e cooperando com as células colunares na absorção de metabólitos (CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM 1999, KLOWDEN, 2002).

As células regenerativas são indiferenciadas e responsáveis pela renovação do epitélio do intestino médio, substituindo as células que se desgastam e se perdem durante o processo de digestão, além de possibilitar o crescimento do canal alimentar a cada ecdise. São encontradas na base do intestino médio, isoladamente ou em grupos formando ninhos, não havendo diferenças em sua abundância ao longo do mesêntero (MARTINS et al 2006; WANDERLEY-TEIXEIRA et al 2006; PINHEIRO et al 2010).

O lúmen do ventrículo dos insetos, em geral, é revestido por uma camada extracelular denominada membrana peritrófica, que forma uma barreira permeável entre o bolo alimentar e o epitélio estimulando os processos digestivos e defendendo a superfície do epitélio da abrasão mecânica, assim como de toxinas e patógenos (TELLAM, 1996), porém as proteínas Cry por seu modo de ação típico são capazes de atravessar esse mecanismo de defesa do inseto (BRAVO et al., 2007).

2.6 - Modo de ação das proteínas Cry

Dois modelos, baseados em dados experimentais, explicam o modo de ação das toxinas Cry. As primeiras etapas desses dois modelos são idênticas: após a ingestão dos cristais, eles são solubilizados no intestino do inseto, local com pH alcalino, liberando as pró-toxinas que são clivadas por proteases do próprio inseto, resultando em toxinas ativas, com cerca de 60 a 70% do tamanho da pró-toxina (BRAVO et al., 2007).

Para liberar o núcleo inseticida é necessário que a proteína, em forma de cristal, seja primeiramente ingerida para depois, em ambiente alcalino, ser quebrada em pontos específicos que liberam este núcleo ativo. No sistema digestivo de humanos e animais superiores o ambiente é ácido e a proteína é completamente degradada em minutos, desta forma, a proteína não apresenta nenhum efeito em animais superiores ou humanos (SCHNEPF et al., 1998).

Após o núcleo ativo ser liberado ele deve se ligar a receptores específicos na parede do intestino do inseto-alvo; diferentes proteínas têm diferentes especificidades devido à variação destes receptores das diferentes espécies, ordens e classes de insetos (GOMEZ et al., 2003; PIRES, 2004).

As toxinas Cry, na forma cristalizada, uma vez ingeridas por lagartas suscetíveis e atingindo o intestino, se ligam a locais específicos em micro vilosidades das células do intestino médio da lagarta, causando lise osmótica por meio da formação de poros na membrana levando a ruptura do intestino e consequentemente sua morte (HERRERO et al, 2001; PARKER, 2005; OESTERGAARD et al. 2007; PIGOT, 2007).

As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, para de se alimentar (HOFTE e WHITELEY, 1989).

Um determinado isolado de *Bt* pode produzir um ou mais tipos de cristais, que por sua vez pode conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. Por exemplo, *Bt kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70kDa), enquanto

Bt tenebrionis possui uma única toxina com peso molecular de 67 kDa (LERECLUS et al., 1993; GLARE e O'CALLAGHAM 2000).

Estudos detalhados da atividade das δ -endotoxinas demonstram existir duas etapas na ligação da toxina ao receptor, envolvendo processos reversíveis e irreversíveis. No primeiro caso, mesmo havendo afinidade dos receptores de membrana no intestino dos insetos com as proteínas Cry, algumas toxinas podem ligar-se aos receptores, sem essa ligação ser suficiente para causar a morte das larvas de inseto (ARONSO e SHAY, 2001).

Isso se deve ao fato de essas toxinas apresentarem especificidade reduzida, resultando em uma ligação pouco estável e reversível com o receptor, ou seja, a toxina reconhece o receptor, mas não se liga irreversivelmente a ele, não se projetando para dentro da membrana. No segundo caso envolve uma ligação forte da toxina ao receptor e a inserção da toxina na membrana, com consequente desenvolvimento da doença no inseto (ARONSO e SHAY, 2001).

Estudos histológicos conduzidos por Martinez-Ramirez et al. (1999) demonstraram haver aumento na quantidade de células epiteliais na região do intestino médio nas populações resistentes de lagartas tratadas com estas toxinas; assim a ação da toxina Cry também está relacionada à alteração da morfologia e quantidade das células do intestino médio e, portanto, a conformação de receptores.

O modelo de ação denominado “formação de poros” é o mais antigo e parece ser o mais comum entre as diferentes ordens de insetos (Diptera, Lepidoptera e Coleoptera). Segundo esse modelo, a ligação da toxina com receptores específicos levaria a formação de oligômeros de toxinas, os quais se ligariam a receptores secundários da membrana da célula intestinal, como resultado dessa ligação, ocorreria a inserção da toxina oligomérica na membrana da célula epitelial intestinal, resultando em poros nesse epitélio (BRAVO et al., 2004)

Outro modelo relatado por alguns autores, é denominado “transdução de sinal”, este modelo foi estudado em apenas poucos insetos-alvo, de acordo com esse modelo, a ligação da proteína Cry com receptores específicos, induziria uma série de reações intracelulares, que envolvem a proteína G e a adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular e ativação da proteína Quinase A; todas essas consequências provocariam desequilíbrio da pressão interna celular, danificando-a (SOBERÓN et al., 2009; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

Uma vez ativada pelas proteases intestinais, as toxinas se ligam a uma caderina, isto por sua vez causa uma alteração conformacional que favorece a clivagem proteolítica ao nível do resíduo F50, localizado dentro da alça que liga as hélices a1 e a2, as primeiras hélices da região terminal N do domínio formador do poro da molécula da toxina. Posteriormente, a remoção da hélice a1 permite que o restante da toxina oligomerize e forme uma estrutura denominada “estrutura pré poro” (GÓMEZ et al., 2003).

Este oligômero se liga a um receptor aminopeptidase que possui uma afinidade muito maior por esta proteína do que a toxina monomérica (BRAVO et al., 2004). Finalmente, a ligação a uma aminopeptidase favorece a inserção do pré poro na membrana que fica mais permeável em função do poro resultante.

Vachon et al. (2012) ressaltaram que o mérito deste modo de ação reside no fato de que a interação das toxinas com células sensíveis, sem dúvida, tem consequências importantes no metabolismo celular e sua regulação, os quais são alterados desencadeando mudanças no funcionamento normal do epitélio, porém, ante a complexidade, o método de formação de poros seria o mais provável de acontecer.

O intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos ingeridos do patógeno. Porém as δ -endotoxinas causam a paralisia do intestino, retendo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria (KNOWLES, 1994).

Devido à importância do esporo na patogenicidade desta bactéria, a maioria dos produtos comercializados possui os esporos e as toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica (COPPING e MENN, 2000).

Alterações do canal alimentar, principalmente no mesêntero podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de insetos, bem como todos os eventos fisiológicos, pois esses processos dependem da alimentação adequada de sua absorção e transformação no canal alimentar (MORDUE (LUNTZ) e NISBET 2000), a ação das toxinas, seja por qualquer um dos modelos, resulta na paralisia do aparelho digestório, ocasionando morte por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia (SOBERÓN et al., 2009).

2.7 – Características do Dipel®

A utilização de bioinseticidas, assim como dos demais agrotóxicos, baseia-se na relação “riscos x benefícios” que requer ensaios, os quais revelam a segurança ao homem e ao meio ambiente. Sendo assim, a legislação deve assegurar a sociedade que o bioinseticida autorizado para comercialização e aplicação no controle biológico foi adequadamente avaliado quanto aos parâmetros agrônômicos, saúde pública e meio ambiente (MEADOWS, 1993; ALVES, 1998; GALLO et al., 2002).

Embora os produtos comerciais à base de *Bt* sejam utilizados contra lepidópteros, dípteros e coleópteros, mais de 1.000 espécies de insetos, pertencentes a diversas ordens de insetos, são suscetíveis a este patógeno (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000). Dos 572 lepidópteros suscetíveis ao *Bt* elencados por estes autores, 83 (14,5%) são noctúdeos. O bioinseticida à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (*Bt kurstaki* HD-1). Este produto, pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente contra mais de 170 lepidópteros praga (BEEGLE e YAMAMOTO, 1992; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

O Dipel® é um inseticida biológico, aplicado nas culturas em pulverização, utilizando equipamentos convencionais de aplicação e quantidade adequada de água, a fim de proporcionar uma boa cobertura para proteger o cultivo adequadamente. Este produto é composto por *Bt kurstaki* HD-1 com 7.600 Unidades Internacionais de Potência por mg e concentração mínima de 27,5 bilhões de esporos viáveis por grama do produto; é fabricado e formulado pela “Abbott Laboratories Chemical & Agricultural Products” (ROSAS-GARCÍA, 2006; PARRA, 2010).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no período de janeiro a novembro de 2015 no Laboratório de Entomologia Agrícola Aplicada da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) em Belém-PA, sendo as lagartas coletadas na plantação comercial de dendezeiros da empresa Companhia Reais Agroindustriais, pertencente ao Grupo AGROPALMA, localizada no km 70 da Rodovia PA-150, Município de Tailândia, Pará (Latitude: 2° 38' S. Longitude: 48° 13' W. Gr.).

3.1 - Obtenção do inseto-praga

Lagartas de *B. sophorae*, foram coletados a campo de através da busca de ninhos em período diurno, foram realizadas três visitas aos pomares da plantação comercial de óleo de palma do grupo AGROPALMA, cinco ninhos foram coletados os quais foram trazidos em caixas plásticas de 15 x 30 cm até o laboratório onde foram iniciadas e processadas as análises, em média 300 lagartas, em diferentes fases de crescimento, foram encontradas em cada ninho, posteriormente, as lagartas foram classificadas de acordo com seu tamanho médio e estágio de desenvolvimento e colocadas em grupos de 10 lagartas, a $26 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e foto fase de 12h, em recipientes plásticos medindo 15 cm de altura x 30 cm de raio, sendo alimentados *ad libitum* com folhas de palma de óleo.

3.2 - Bioensaios

Os tratamentos constaram de quatro concentrações de Dipel®, utilizando-se as doses de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 L/ha. As folhas de palma de óleo foram imersas nessas soluções durante cinco minutos, em seguida colocadas para secar em condições ambientais, e após duas horas, 200 gramas foram transferidos para os recipientes plásticos, nos quais foram colocadas dez de lagartas de características morfológicas idênticas, em cada, sendo 25 recipientes para cada tratamento, empregando-se 250 lagartas para cada concentração, totalizando 1000 lagartas.

Um grupo controle foi constituído com igual número de indivíduos de mesmas características, alimentado e mantido nas mesmas condições dos grupos experimentais, porém sem o uso de bioinseticida, para avaliação de mortalidade por outras causas ou sobrevivência.

A análise dos comportamentos das lagartas submetidas aos tratamentos foi realizada através de observações realizadas a cada 6 horas, nestes intervalos eram anotadas características como a redução e qualidade da movimentação (móvel ou imóvel), alteração de coloração e brilho do tegumento, alterações fisiológicas, consumo alimentar ou a morte das lagartas.

O total de 200 gramas de folhas foram colocadas à disposição das lagartas em cada recipiente plástico a cada observação. A medida da quantidade de alimento consumido foi feita através da resultante da diferença entre a quantidade de alimento

oferecida as lagartas, no início e a sobra de alimento ao final de cada período de 6 horas estudo.

3.3 - Preparação de peças histológicas

Entre 6 e 48 horas após a infecção, com intervalos de 12 horas, todas as lagartas foram utilizadas nos cortes histológicos. As lagartas, imóveis ou mortas, foram retiradas dos recipientes, e após dissecação, foram removidos segmentos no 1/3 do intestino médio, retirando cerca de 1 cm de cada peça com auxílio de régua, pinça e tesoura. As lagartas foram levadas para a dissecação após a morte, e na ausência de mortalidade ou imobilidade, as lagartas foram imobilizadas através de baixas temperaturas (4° C). O período máximo de observação foi de 48 horas. As peças histológicas produzidas foram submetidas a preparação para avaliação histológica e citológica e coradas através da técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) de acordo com Junqueira e Junqueira (1983). As seguintes etapas foram realizadas:

1 – Fixação (formol a 10%): Esta substância tem como característica evitar o processo de autólise da célula, impedir a destruição do tecido por procariontes, endurecer o material para melhor tratamento posterior e aumentar a capacidade de coloração do material, o tempo de fixação variou entre 12 e 24 horas. As peças foram cortadas, colocadas em cassetes histológicos e mergulhados em formol à 10% para a fixação do material.



Figura 1 – Cassetes histológicos mergulhados em formol à 10% para a fixação do material.

2 – Desidratação: O material foi mergulhado em frascos contendo álcool em concentrações crescentes iniciando com álcool a 85%; seguindo à concentração de 95% até o álcool absoluto repetido 3 vezes para retirada de água de sua estrutura.

3- Diafinização ou Clareamento: Utilizou-se Xilol para permitir melhor a penetração de parafina na peça, num total de 3 banhos de xilol.

4- Inclusão: O material foi colocado em recipientes contendo parafina líquida a 60° C e colocado em estufa na mesma temperatura, num total de 3 banhos de parafina, cada um com duração de 30 minutos. Em seguida, foi realizada a inclusão propriamente dita, derramando-se numa forma plástica a parafina com o material.

5- Microtomia: Os blocos de parafina foram cortados para a obtenção de cortes do material, utilizando-se para isso o aparelho denominado micrótomo. Os cortes foram realizados com espessura de 5 a 6 micrômetros para a melhor visualização das características do tecido.

6- Distensão: Os cortes são distendidos em água aquecida a 56° C em aparelho aquecedor com termostato para evitar micro dobras no material.

7- Montagem: Coleta do material do banho maria mantendo-o esticado sobre a lâmina. Em seguida a lâmina é colocada sobre uma platina aquecedora para que seja feita a secagem, a fusão da parafina impregnada no tecido e evitar o aparecimento de micro dobras.

8- COLORAÇÃO: Processada através dos seguintes passos:

- Xilol durante 10 minutos para retirada do resíduo de parafina.
- Tratamento com álcool.
 - Imersão em álcool absoluto. (2 x)
 - Imersão em álcool 95%.
- Lavar a lâmina em água corrente durante 3 minutos.
- Corar pela hematoxilina (corante básico) durante 5 minutos.
- Lavar a lâmina em água corrente durante 3 a 5 minutos.
- Corar, pela eosina (corante ácido) durante 30 segundos.

Após a coloração, as lamínulas foram fixadas nas lâminas com “Permount”, estando pronta para a visualização no microscópio ótico comum em aumento de 400 e 1000X, e as imagens feitas microscópio Leica.

Um grupo controle foi mantido para cada concentração testada, sendo retiradas destes grupos uma lagarta ao final de 48 horas, para análise semelhante as lagartas empregadas nos ensaios.

A análise histológica do epitélio foi feita observando-se as alterações morfológicas e estruturais encontradas relacionando-as com as concentrações empregadas para cada um dos tratamentos.

As observações foram feitas em microscopia ótica comum em aumentos de 400 e de 1000 x.

3.4 - Análise estatística

Os resultados dos bioensaios foram submetidos aos testes de normalidade (teste de Kolmogorov) e de homogeneidade da variância (teste de Bartlett) e, sempre que necessário, transformados, para atender os requisitos da análise de variância (ANOVA). Em seguida submetidos à ANOVA, e quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram conduzidas empregando o software SAS (SAS Institute, 2002).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas de *B. sophorae* alimentadas com folhas pulverizadas com o produto *Bt* apresentaram progressiva redução de sua mobilidade relacionada ao consumo de folhas pulverizadas como primeiros sinais de intoxicação, a qual já sinalizam a ação e efeito do *Bt* nas lagartas.

Embora não sejam tão fáceis de detectar, as observações destes efeitos pré-morte representaram um importante parâmetro na avaliação prévia da existência de atividade tóxica de *Bt* para a praga testada sendo importantes sua observação em nível de tempo e de concentração do produto testado corroborando as observações de Polanczyk e Alves (2003).

Não foram observadas lagartas imóveis ou com a mobilidade reduzida, em até 12 horas de experimento, nos ensaios onde a concentração do produto empregado para a avaliação estava nas concentrações mais baixas, sendo esta característica visualizada, neste intervalo de tempo, apenas nas concentrações de 0,75 L/ha e 1,0 L/ha, demonstrando a importância da concentração do produto nos tratamentos.

As lagartas empregadas neste experimento, após 12 horas, apresentaram-se mais lentas e pouco ativas reduzindo gradualmente a busca por alimentos (Tabela 1), as fezes coletadas dos recipientes eram amolecidas e mais fétidas e o tegumento das lagartas apresenta-se mais fosco e com coloração mais escura, sugerindo a evolução do processo infeccioso, sendo estes dados semelhantes aos que foram descritos por Nogueira e Habib (2001) em trabalho no qual também foram utilizados lepidópteros.

Tabela 1 – Quantidade de alimento em gramas consumido de acordo com tempo de ensaio e concentração de produtos *Bt* utilizado para pulverização.

Tempo X Consumo Concentração	06 horas (Ofertado/Consumido)	12 horas (Ofertado/Consumido)	24 horas (Ofertado/Consumido)
0,25 L/ha	200/140	200/133	200/133
0,5 L/ha	200/137	200/139	200/114
0,75 L/ha	200/125	200/114	200/85
1,0 L/ha	200/139	200/100	200/78
Controle	200/145	200/153	200/149
Médias de consumo	137,2 a	127,8 a	111,8 b

Houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si.

A redução da motilidade associada a diminuição do apetite e o abandono do alimento foram os sinais mais significativos e iniciais da ação da bactéria e de suas proteínas sobre as lagartas. Os episódios regurgitações e o surgimento de diarreia, a perda de brilho e coloração fosca do tegumento com tonalidades de cor marrom escura, perda da agilidade das lagartas, flacidez e a parada total dos movimentos foram os sinais pré-morte observados.

Estes aspectos do quadro sintomatológico pré-morte das lagartas também foram observados relatados por diversos autores desde 1959, em lagartas de lepidópteros cujos resultados são concordantes com este trabalho (BERTI FILHO & GALLO, 1977; HABIB, 1982; HABIB & ANDRADE 1998; BRIGHENTI et al., 2005).

De acordo com os dados obtidos e anotados (Tabela 2) observa-se que apenas na concentração mais alta (1,0 L/ha) pode-se perceber o surgimento de diarreia nas 6 horas iniciais do experimento, na concentração mais baixa do produto (0,25 L/ha) os primeiros sintomas só começaram a ser percebidos após 24 horas de experimento, sendo a diminuição da motilidade a primeira evidência anotada, na concentração de 0,5 L/ha a redução da motilidade e a diarreia foram os primeiros sinais de infecção percebidos, em 24 horas de experimento, pelo menos um sinal já era evidenciada nas lagartas em todas as concentrações e em 36 horas de experimento quase todos os sinais de intoxicação poderiam ser vistos.

Tabela 2 - Ocorrência de sinais pré-morte em lagartas de *B. sophorae* alimentadas com folhas de palma de óleo tratadas com Dipel® de acordo com a concentração do produto e o tempo de experimento:

Sinais pré-morte	0,25 L/ha				0,5 L/ha				0,75 L/ha				1,0 L/ha			
	6	12	24	36	6	12	24	36	6	12	24	36	6	12	24	36
Redução da motilidade	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Redução do apetite	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Diarreia	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Flacidez	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Imobilidade total	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Redução do brilho do tegumento	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Alteração de cor do tegumento	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Total	0	0	5	6	0	2	6	7	0	3	7	7	1	7	7	7

Legenda: + Presença do sinal; - Ausência do sinal.

A redução de movimentos até a total imobilidade variou de acordo com a concentração do produto, pode-se observar que mais concentrado o produto mais rapidamente as lagartas tornavam-se totalmente imóveis. Outros sinais como alterações da coloração e redução do brilho do tegumento, que começaram a se tornar mais evidentes após 12 horas do início da alimentação das lagartas, apesar de também ter relação com a concentração, surgiram quase que ao mesmo tempo em todas as concentrações, sendo que estas mudanças mais tardias sinalizavam o início da ocorrência de desequilíbrio fisiológico e consequentes alterações teciduais (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de lagartas imóveis ou com mobilidade reduzida de acordo com tempo de ensaio e concentração de produtos *Bt* utilizado para pulverização.

Concentração	06 horas	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
0,25 L/ha	0	0	89 (35,6%)	188 (75,2%)	248 (99,2%)
0,5 L/ha	0	0	107 (42,8%)	195 (78%)	248 (99,2%)
0,75 L/ha	21(8,4%)	100 (40%)	208 (16,6%)	240 (96%)	250 (100%)
1,0 L/ha	100(40%)	190 (76%)	239 (95,6%)	242 (96,8%)	250 (100%)
Controle	0	0	0	0	0
Médias	30,25±0,2a	72,5 ±0,2 b	160,75 ±0,4c	216,25 ±1 d	249 ±1 e

Houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si.

Num intervalo entre 6 até 48 horas, dependendo da concentração do produto *Bt* empregado na pulverização, as lagartas foram levadas a dissecção do intestino, verificando-se que o intestino permaneceu cheio de alimentos, digeridos totalmente ou parcialmente, indicando uma paralisia intestinal e consequentemente do processo digestivo e na análise histológica já eram possíveis perceber alterações no arcabouço celular do intestino médio (FIGURA 2).

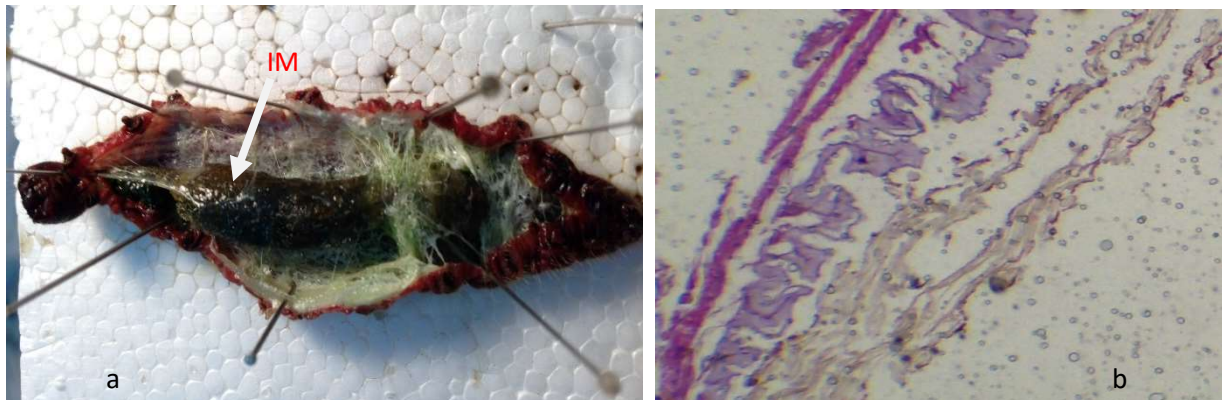


Figura 2: a) Lagarta de *B. sophorae* dissecada após paralisia total de movimentos, alteração de coloração e diminuição do brilho de seu tegumento demonstrando o intestino médio (IM) ainda repleto de alimentos caracterizando a paralisia deste órgão, b) alteração na organização das paredes que compõe o intestino médio coradas por HE observada em M.O (400x). O intestino médio é o principal local de digestão e absorção de alimentos, portanto constitui a região mais vulnerável à ação de elementos estranhos ingeridos, esta região possui barreiras contra agentes invasores, como a membrana peritrófica e as enzimas digestivas (MATOS et al 1999, MOHAN et al 2006).

Esta membrana tem papel fundamental na biologia do intestino médio, por estar posicionada entre o conteúdo alimentar e o revestimento epitelial desempenhando a função de proteger esse epitélio de danos mecânicos, exercendo ainda a função de barreira contra as toxinas e substâncias químicas prejudiciais ao inseto (LEHANE, 1997), porém apesar desta proteção, os efeitos tóxicos do *Bt* foram percebidos rapidamente nas maiores concentrações testadas, mesmo evidenciando a presença da membrana peritrófica íntegra em alguns intervalos de tratamento, essa estrutura não foi eficiente para impedir a ação do *Bt* sobre o epitélio e evitar os danos ocasionados a este tecido (Figura 3).

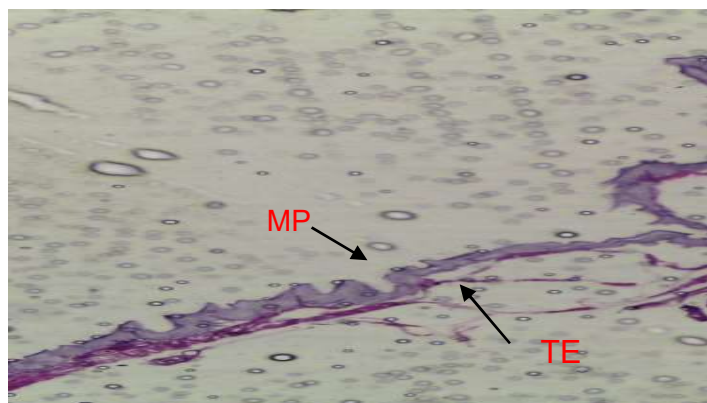
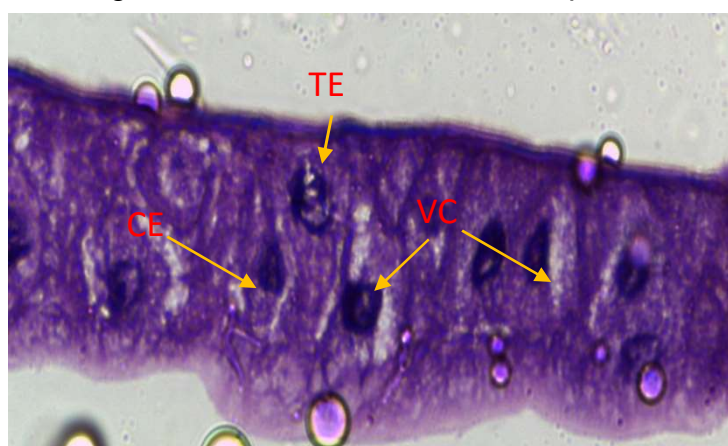


Figura 3: Corte histológico de intestino médio de *B. sophorae* corado pelo método HE em aumento de 100x, de epitélio demonstrando membrana peritrófica (MP) integra tecido epitelial (TE) degradado pela ação e toxinas *Bt*.

Apenas nas concentrações maiores que 0,50 L/ha (0,75 e 1,00 L/ha) foram observadas lagartas imobilizadas em 6 horas de ensaio, já haviam pequenas mudanças na cor e brilho do tegumento, sendo as alterações no epitélio discretas neste momento, sendo observadas apenas um alongamento de células epiteliais e início de vacuolização no citoplasma de algumas células (Figura 4), sendo estas observações semelhantes aos achados descritos em literaturas (GRIEGO et al., 1980; MATHAVAN et al., 1989; BRAVO et al., 1992).

Figura 4: Corte histológico de intestino médio de *B. sophorae* corado pelo método HE



em aumento de 1000x, epitélio (TE) demonstrando um alongamento de células epiteliais (CE) e início de vacuolização (VC) no citoplasma destas células.

As observações realizadas após 24 horas de experimento demonstraram o efeito provocado mais evidente, alterações em micro vilosidades do intestino médio, alongamento celular, projeção de células para a luz intestinal, degradação da

membrana peritrófica e ruptura do epitélio já eram visíveis neste intervalo, porém tornaram-se mais incisivas e mais intensas, após 36 horas de tempo, onde percebe-se a vacuolização afetando o citoplasma de um número bem maior de células epiteliais com algumas projeções destas células na luz intestinal, associadas a degradação da membrana peritrófica e de micro vilosidades (Figura 5).

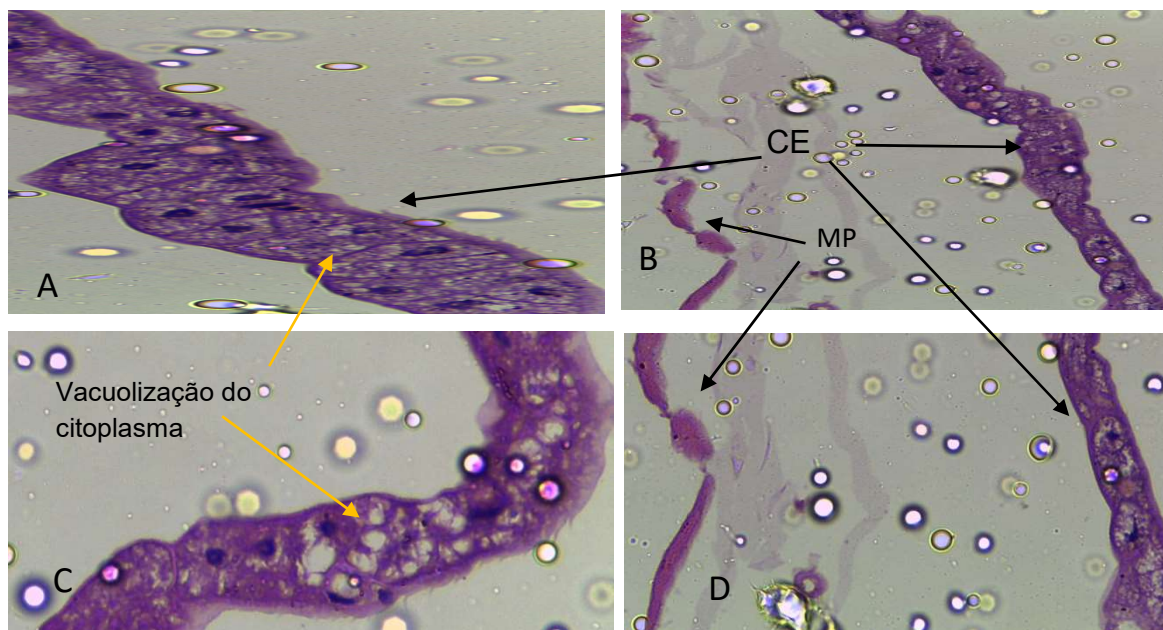


Figura 5: Corte histológico de intestino médio de *B. sophorae* corado pelo método HE em aumento de 1000x, após alimentação com folhas pulverizadas com produto *Bt.*: (A) epitélio (TE) após 24 horas de ensaio demonstrando um alongamento de células epiteliais (CE) vacuolização do citoplasma celular, afetando o citoplasma de células epiteliais; (B) Corte histológico de intestino médio de *B. sophorae* corado pelo método HE em aumento de 400x, após 24 horas de ensaio, demonstrando algumas projeções de células na luz intestinal, associadas a degradação da membrana peritrófica (MP) e de micro vilosidades; (C) epitélio (TE) após 36 horas de ensaio, demonstrando um alongamento mais acentuado de células epiteliais (CE) aumento da vacuolização do citoplasma celular, afetando o citoplasma de um número maior de células epiteliais; (D) Corte histológico de intestino médio de *B. sophorae* corado pelo método HE em aumento de 400x, após 36 horas de ensaio, demonstrando aumento nas projeções de células na luz intestinal, associadas a degradação da membrana peritrófica (MP) e de micro vilosidades.

Correia et al. (2009), avaliando a ação do extrato de *Azadirachta indica* em lagartas de *S. frugiperda*, verificaram que as alterações morfológicas mais incisivas só foram evidenciadas no intestino médio destas lagartas com o aumento do tempo de exposição, sendo a intensidade das alterações dependente do tempo e da

concentração utilizada, corroborando com o resultado encontrado neste trabalho onde se evidencia que a ação do produto *Bt* testado é mais rápida na concentração mais alta e alteração celular se torna mais evidente.

De acordo com Aranda et al. (1996), 15 minutos após a aplicação das Cry 1C e Cry 1D em *Spodoptera frugiperda*, já é possível observar mudanças em suas células epiteliais, porém a vacuolização do citoplasma, a degradação da membrana e a destruição das células são observadas somente 1 hora após a aplicação das toxinas de *Bt*. Embora não tenha sido realizada, neste experimento uma avaliação neste intervalo de tempo, as observações feitas neste trabalho sugerem também uma ação rápida das toxinas de *Bt* no intestino médio de *B. sophorae* haja visto os sinais de infecção percebidos a partir da 6^a. hora de experimento nas concentrações mais altas testadas.

Além dos efeitos já mencionados, alguns autores (ARANDA et al., 1996, CORREIA et al., 2009), também verificaram a desorganização do intestino médio e a hipertrofia das células epiteliais que foram desprendidas e lançadas para dentro do lúmen, estas ocorrências também visualizadas neste trabalho no período de exposição superior a 36 horas de ensaio (Figura 6).

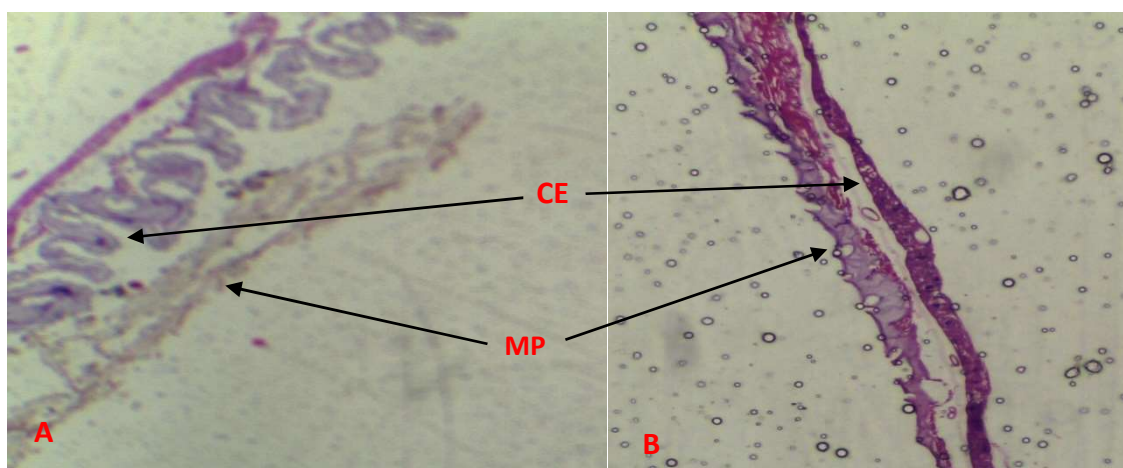


Figura 6: A) Células epiteliais do intestino médio de lagartas de *B. sophorae* alimentadas com folhas de palma de óleo tratadas com Dipel® hipertrofiadas e soltas no lúmen intestinal e membrana peritrófica destruída, B) Células epiteliais do intestino médio de lagartas de *B. sophorae* alimentadas com folhas de palma de óleo de palma sem tratamento células sem alteração e membrana peritrófica íntegra (1000x).

Foi observada uma alteração significativa no epitélio do intestino médio das lagartas redundando na destruição deste e consequentemente na perda da função sendo está a causa da morte do inseto, efeito também descrito por Baines et al (1997). (Figura 7)

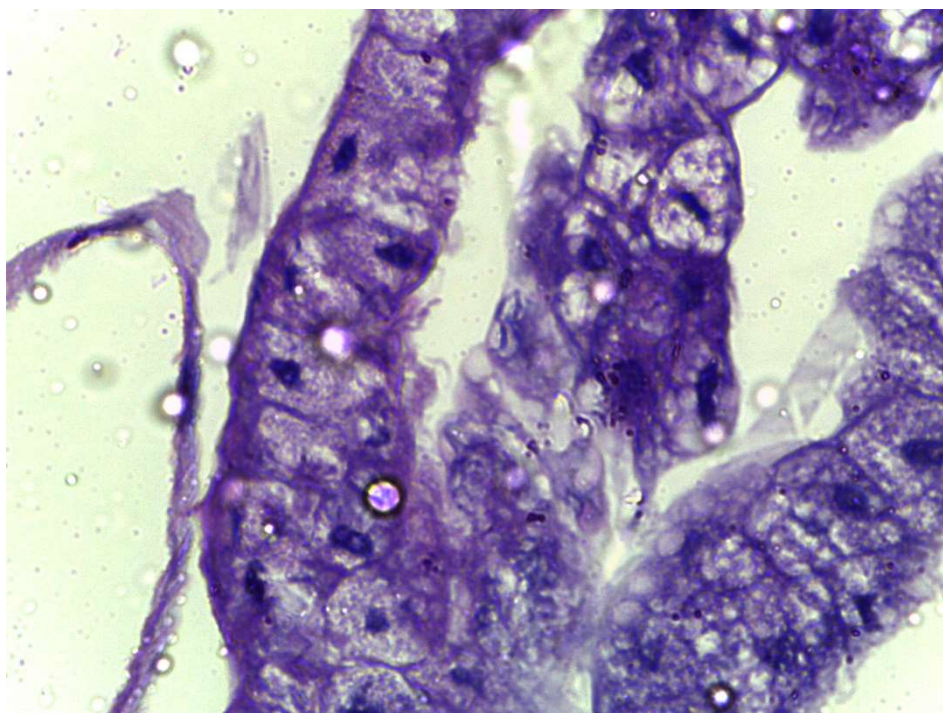


Figura 7: Alteração significativa no epitélio do intestino médio das lagartas, demonstrando vacuolização intensa de citoplasma das células epiteliais, núcleos celulares picnóticos redundando na destruição do epitélio e consequentemente na perda da função sendo está a causa da morte do inseto.

Logo após a morte as lagartas adquiriram sintomas externos como coloração preta, iniciando-se a deterioração de seus tecidos acompanhados de odor fétido. Este fato foi também relatado por Habib e Andrade (1998) em lagartas do noctuídeo *Alabama argillacea* (Hubner, 1818) e o brassolídeo *Brassolis sophorae* (Linnaeus, 1758) infectadas por *Bt*, sendo esta ocorrência também verificada neste trabalho e são características de infecção bacteriana o que sugere que os esporos presentes no produto Dipel® evoluem à forma vegetativa da bactéria exacerbando os efeitos do *Bt* (Figura 8).



Figura 8: A) Lagartas de *Brassolis sophorae* logo após a morte apresentando sintomas externos como coloração preta, iniciando-se a deterioração de seus tecidos acompanhados de odor fétido, B) Lagartas de *Brassolis sophorae* recém retirada de ninhos sem os efeitos da intoxicação.

As lagartas utilizadas nos grupos controle evoluíram para a forma de pupas e posteriormente para forma adulta (Figura 9).



Figura 9: *Brassolis sophorae* de grupo controle em estágio de pupa.

5 – CONCLUSÕES

- Todas as lagartas de *B. sophorae* alimentadas com folhas pulverizadas com produtos à base de Bt, nas condições experimentais, morreram demonstrando a efetividade deste entomopatógeno para esta espécie.
- Os sinais de infecção começaram entre 6 e 12 horas dependendo da concentração testada, mas iniciaram com imobilidade ou redução de mobilidade, evoluindo para alteração (escurecimento) do tegumento, produção de fezes amolecidas e posterior morte.
- A utilização do Dipel® nas concentrações 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 L/ha afetou a fisiologia de lagartas de *B. sophorae*.
- As concentrações mais altas (0,75 e 1,00 L/ha) de produtos à base de Bt (Dipel®) determinaram efeitos mais rápidos e mais significativos em lagartas de *B. sophorae*
- As proteínas Cry por seu modo de ação típico são capazes de atravessar a membrana peritrófica, mecanismo de proteção do epitélio intestinal do inseto.
- A degeneração celular foi caracterizada por uma intensa vacuolização do citoplasma das células epiteliais e consequente morte celular.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. L., SILVA FILHO, J. C., GODOI, A. R., CARMO, C. A., EDUARDO, J. L. P., Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 250-258, 2008.

ABOUSSAID, H.; EL-AOUAME, L.; EL-MESSOUSSI, S.; OUFDUO, K., Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae), **Journal of Environmental Protection**, v. 1, p. 337-345, 2010. DOI:10.4236/jep.2010.14040.

ABOUSSAID, H.; VIDAL-QUIST, J.C.; OUFDUO, K.; EL MESSOUSSI, S.; CASTAÑERA, P.; GONZÁLEZ-CABRERA, J., Occurrence, characterization and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from argan fields in Morocco. **Environmental Technology**, v. 32, p. 1383-1391, 2011. DOI:10.1080/09593330.2010.536789.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Brasília: ANVISA. 2013. 26p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório Complementar – 2012, Brasília: ANVISA. 2014.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 497p. 2014.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A., Banco de microrganismos entomopatogênicos: biodiversidade para o controle microbiano de pragas, **Biociência**, São Paulo, v. 20, p. 30-33, 2001.

ALVES, S. B., Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: _____. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**., Piracicaba, 1163 p., 1998.

ARANDA, E., SANCHEZ, J., PEFEROEN, M., GÜERECA, L., BRAVO, A., Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae), **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARGÔLO-FILHO, R.C.; LOGUERCIO, L.L., *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches, **Insects**, v. 5, p. 62-91, 2014. doi:10.3390/insects5010062.

ARONSO, A. I.; SHAY, Y., Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin are so effective: unique features of their mode of action, **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, n. 1, p. 1-8, 2001.

AZAMBUJA, A. O.; ALLES, G. C.; FRITZ, L. L.; RECHE, M. H. L. R.; FIUZA, L. M., Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos, **Biociência**, São Paulo, v. 38, p. 14-23, 2009.

BAILEY, L. H., Certain palms of Panamá. *Gentes Herbarum*: occasional papers on the kinds of plants. **Ithaca**, v. 3, p. 33-116, 1933.

BAINES, D., SCHWARTZ, J. L., SOHI, S., DEDES, J., PANG, A., Comparison of the response of midgut epithelial cells and cell lines from lepidopteran larvae to CryIA toxins from *Bacillus thuringiensis*, **Journal of Insect Physiology**, v. 4, p. 823-831, 1997.

BASTOS, T. X.; MÜLLER, A. A.; PACHECO, N. A.; ASSAD, E. D.; MARQUES, A. F. S. Zoneamento de riscos climáticos para cultura do dendezeiro no estado do Pará, **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Belém, v. 9, n. 3, p. 564- 570, 2001.

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T., Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development, **The Canadian Entomologist**, v. 124, n. 3, p. 587-616, 1992. DOI: <http://dx.doi.org/10.4039/Ent124587-4>.

BERGAMASCO, V.B.; MENDES, D.R.P.; FERNANDES, O.A.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F., *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in Spodoptera spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 152-158, 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2012.11.011.

BERLINER, E., Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v. 2, p. 29-56, 1915.

BERTI FILHO, E. & GALLO, D., O uso de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de lagarta das palmeiras *Brassolis astyra astyra* Godart, 1765 (Lepidoptera, Brassolidae). An. **Sociedade Entomologia Brasileira.**, v. 6, p. 85-91, 1977.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J., Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications **Journal of molecular biology**, v. 348, n. 2, p. 363–382, 2005.

BLANCO, C.A.; GOULD, F.; GROOT, A.T.; ABEL, C.A.; HERNANDEZ, G.; PERERA, O. P.; TERAN-VARGAS, A.P., Offspring from sequential matings between *Bacillus thuringiensis* - resistant and *Bacillus thuringiensis* - susceptible *Heliothis virescens* Moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 861-868, 2010. <http://dx.doi.org/10.1603/EC09232>.

BRAAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R., Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento, Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 13 nov. 2015.

BRAVO, A., HENDRICKX, K., JANSSENS, S. PEFFEROEN, M., Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, n. 3, p. 247-253, 1992.

BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C. SANCHEZ, J.; MIRANDA, R. ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M., Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimemical Biophysical Acta**, v. 1667, p. 38–46, 2004.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M., Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Amsterdam, v. 49, p. 423–435, 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERON, M., *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423–431, 2011. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M., Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, v. 6, 17–26, 2012. doi:10.1111/j.1751-7915.2012.00342. x.

BREWER, M.J.; GOODELL, P.B., Approaches and incentives to implement integrated pest management that addresses regional and environmental issues, **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 41–59, 2012. DOI: 10.1146/annurev-ento-120709-144748.

BRIGHENTI, D. M., CARVALHO, C. F., CARVALHO, G. A., BRIGHENTI, C. R. G., Efficiency of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) for control of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), *Ciência e agro tecnologia*, v. 29 n. 1, Lavras, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000100007>.

BRISTOW, R. C., A review of de genus *Brassolis* Fabricius in Colombia and Ecuador with description of two new taxa (Lepidoptera, Nymphalidae), **Zootaxa**, Bogotá, v. 1806, p. 47-58, 2008.

BONETTI FILHO, R.Z., **Comportamento de *Brassolis sophorae* (L., 1758) (Lepidoptera: Nymphalidae), em condições naturais**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1993.

BUCHANAN, R. E., GIBBON, N. E. Endospore forming rods and cocci. In: American Society for Microbiology, Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Co, Baltimore, p. 529-545, 1974.

CAB INTERNATIONAL CENTRE. The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary. Wallingford: CAB International Centre, 2010. 40p.

CARVALHO, A. R. V. de; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M., O Dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.). Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2001.

CARVALHO, M., **Embriogênese Somática a Partir de Folhas Imaturas e Flores Desenvolvidas in vitro de Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009.

CAVALCANTE, V. W., da CRUZ-LANDIM, C., Types of cells present in the midgut of insects: a review, **Naturalia**, São Paulo, v. 24. p. 19-40, 1999.

CHAPMAN, R.F. The insects: structure and function, 4.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 770p., 1998.

CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; ROCHA, R. N. C.; LOPES, M. T. G., Repetibilidade na produção de cachos híbridos interespecíficos entre caiaú e o dendzeiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, p. 249-254, 2009.

COPPING, L. G.; MENN, J.J., Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy, **Pest Management Science**, v. 56, n. 5, p. 651-676, 2000. DOI: 10.1002/15264998(200008)56:8<651: AID-PS201>3.0.CO;2-U.

CORREIA, A. A., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TEIXEIRA, A. A.C., OLIVEIRA, J. V., TORRES, J. B., Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 1-9, 2009.

COSTA, J.M., Pragas das palmáceas. Cruz das Almas, Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Leste, 750p., 1973.

COSTA, V. A., BERTI FILHO, E., SATO, M. E., Parasitoides e predadores no controle de pragas, In: PINTO, A. S., NAVA, D. E., ROSSI, M. M., SOUZA, D. T. M. (Eds.), **Controle Biológico de Pragas: na prática**, Piracicaba, ESALQ, p.25-34, 2006.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D. H., Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62(3), p. 807–813, 1998.

CRICKMORE, N., *Bt* toxin list, 2001. Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/list.html. Acesso em 12/08/2015

De MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C., CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E., Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria, **Annual Review Genetics**, v. 37, p. 409–433, 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2012. Disponível em: <http://www.embrapa.br>. Acesso em 15/10/2015.

ESTRUCH, J. J., Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997.

FAO - Food and agriculture organization of the United Nations. FAOSTAT: production oilcrops 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: ago/2015.

FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A., Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232007000100008>.

FERREIRA, J. M. S.; LEAL, E. C., Susceptibilidade da lagarta-da-folha-do-coqueiro, *Brassolis sophorae* L. (Lepidoptera: Brassolidae) ao fungo *Beauveria brongniartii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA E ENCONTRO SOBRE MOSCA-DAS-FRUTAS, Belo Horizonte. Resumos... Belo Horizonte: SEB, p.253, 1989.

FRANQUEVILLE, H., Oil palm bud rot in Latin America, **Experimental Agriculture**, v. 39, p. 225-240, 2003.

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

GITAU, C. W.; GURR, G. M.; DEWHURST, C.; FLETCHER, M. J.; MITCHELL, A., Insect pests and insect-vectored diseases of palms. **Australian Journal of Entomology**, Sidney, v. 48, p. 328-342, 2009.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M., *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 350 p., 2000.

GOMEZ, I.; DEAN, D. H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M., Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity, two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops a-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. **Biochemistry**, Cidade do Mexico, v. 42, p. 10482–10489, 2003.

GRIEGO, V. M., FANCHER, L. J., SPENCE, K. D., Scanning electron microscopy of the disruption of tobacco horn worm, *Manduca sexta*, midgut by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York v. 35, n. 2, p. 186-189, 1980.

HABIB, M.E.M. **Patogenicidade de duas variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larvas de Lepidoptera e Diptera**. São Paulo: 1982. 163p. [Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biologia/UNICAMP, Campinas].

HABIB, M. E. M., ANDRADE, C. E. S., Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, p. 383-446, 1998.

HARPER, M. S., GRANADOS, R. R., Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. **Tissue Cell**, Londres, v. 31, p. 202-211, 1999.

HARPER, M. S., HOPKINS, T. L., Peritrophic membrane structure and secretion in european corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*), **Tissue and Cell**, Londres, v. 29. n. 4, p. 463-475, 1997. Doi 10.1016s00408166(97)80032-8.

HARTLEY, C. W. S., **The oil palm**. 2. ed. London: Longhman, 806p, 1977.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J., Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indian meal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1085-1089, 2001.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R., Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

ISHAWATA, S., On a severe flacherie (sotto disease), **Dainihon Sanshi Kaiho**, v. 114, p. 1-5, 1901.

JARIAL, M. S., Electron microscopic study of the anterior midgut in *Cenocorixa bifida* Hung (Hemiptera: Corixidae) with reference to its secretory functions. **Zoo Science**, v. 32, p. 783-790, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA, L. M. M. S., Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.

KLOWDEN, M. J., Physiological systems in insects. New York, Academic Press, 415p., 2002.

KNOWLES, B. H., Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, n. 2, p. 275-308, 1994.

KRONSTAD, J.W., SCHNEPF, H.E., WHITELEY, H.R., Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 1, p. 419-428, 1983.

LEAHANE, M. J., Peritrophic matrix structure and function. **Ann Review Entomology**, v. 42, p. 525-550, 1997.

LEMOS, W.P; BOARI, A.J., Manejo de pragas e doenças no cultivo da palma de óleos nas condições brasileiras. In: RAMALHO FILHO, A. et al. (Org). Zoneamento agroecológico, produção e manejo da palma de óleo na Amazônia. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 145152. 2010.

LERECLUS D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M., Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Eds.). *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: J. Wiley & Sons, p. 37-70, 1993.

LEVY, S. M., FALLEIROS, M. F. A., MOSCARDI, F., GREGÓRIO, E. A., TOLEDO, L. A., Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), **Neotropical Entomology**, v. 33 n. 4 Londrina, 2004 <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000400005>.

LI, M. S.; CARREL, J. J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353 n. 6.347, p. 815-821, 1991.

LOEB, M. J.; MARTIN, P. A. W.; HAKIM, R.S.; GOTO, S.; TAKEDA, M., Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sub lethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*, **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 599-606, 2001.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial da União (11/07/2013) ATO N° 49, de 5 de julho de 2013, Brasília, 2013.

MARTINEZ-RAMIREZ, A.C.; GOULD, F.; FERRE, J., Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sub lethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontecology Scientific Technology**. v. 9, p. 239-246, 1999.

MATOS, T. G. T., GIUGLIANO, L. G., RIBEIRO, B. M., BÃO, S. N., Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatilis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatilis* nucleopolyhedrovirus, International **Journal Insect Morphology and Embryology**, v. 28, p. 195- 201, 1999.

MARTINS, G. F., NEVES, L. A. O., SERRÃO, J. E., The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron** v. 37, p. 161-168, 2006.

MATHAVAN, S., SUDHA, P. M., PECHIMUTHU, S. M., Effect of *Bacillus thuringiensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: A histopathological and histochemical study. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York v. 53, n. 2, p. 217-227, 1989.

MEADOWS, M.P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In.: ENTWISTLE P. (Ed.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice. New York: John Wiley & Sons, p. 193-213, 1993.

MOHAN, S., Ma, P. W. K., PECHAN, T., BASSFORD, E. R., WILLIAMS, W. P., LUTHE, D. S., Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease, **Journal Insect Physiology**, v. 52, p. 21-28, 2006.

MORDUE (LUNTZ) A. J., NISBET, A. J., Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais Sociedade de Entomologia Brasil**, São Paulo, v. 29, p. 615-632, 2000.

MOURA, J. I. L., Polinização do Dendzeiro por *Elaeidobius subvittatus* Faust E *Elaeidobius kamerunicus* Faust (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE) no Sul do Estado da Bahia. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2008.

NEVES, C. A.; BHERING, L. L.; SERRÃO, J. E.; GITIRANA, L. B., FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melicona quadrifasciata anthidioides* (Himenoptera, apidae). **Micron**, v. 33, p. 453-460, 2002.

NOGUEIRA, M. D., HABIB, M. E. M., Biologia e controle microbiano de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (LEPIDOPTERA: HESPERIIDAE): Patologia e susceptibilidade em larvas infectadas por *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (H-3a:3b), **Acta Amazonica**, Manaus, v. 31(4), p. 655-659, 2001.

OESTERGAARD, J.; EHLERS, R. U.; MARTINEZ-RAMIREZ, A. C.; REAL, M. D., Binding of Cyt1 Aa and Cry11 Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brusc border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3623-3629, 2007.

OPPERT, B.; MORGAN, T.D.; KRAMER, K.J., Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67: 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.

PANIZZI, A.R., History and contemporary perspectives of the Integrated Pest Management of soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 119–127, 2013. DOI 10.1007/s13744-0130111-y.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A., *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 37, p. 3-22, 2013. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341. x.

PATEL, K. D.; PURANI, S.; INGLE, S.S., Distribution and diversity analysis of *Bacillus thuringiensis* cry genes in different soil types and geographical regions of India. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York v. 112, p. 116–121, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.10.008>.

PARKER, M. W.; FIEL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PARRA, J. R. P., O controle biológico no Brasil: para onde vamos? **G.Bio**, edição especial, p. 33-36, 2010.

PARRA, E.; PEÑA, J.; ESPARZA, D.; LABARCA, M., Evaluación de substratos orgánicos y em combinación con insecticidas para la captura de adultos de *Opsiphanes cassina* Felder en una plantación de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en el estado Zulia, Venezuela, **Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia**, Zulia, v. 26 p. 455-469. 2009.

PRABHAKAR, A.; BISHOP, A. H., Invertebrate pathogenicity and toxin-producing potential of strains of *Bacillus thuringiensis* endemic to Antarctica. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York v. 107, p. 132-138, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.03.008>.

PEFERÖEN, M., Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 173-177, 1997.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J., Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PINHEIRO, D. O., SILVA, M. D., GREGÓRIO, E. A., Mitochondria in the midgut epithelial cells of sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891), **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 163-169, 2010.

PIRES, V. M.; HENSHAW, J. L.; PRATES, J. A.; BOLAM, D. N.; FERREIRA, L. M.; FONTES, C. M.; HENRISSAT, B.; PLANAS, A.; GILBERT, H. J.; CZJZEK, M., The Crystal structure of the family 6 carbohydrate binding module from *Cell vibrio mixtus* endoglucanase 5a in complex with oligosaccharides reveals two distinct binding sites with different ligand specificities. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 20 p. 2.1560 – 2.1568, 2004.

POLANCZYK, R. A.; DE BORTOLI, S. A.; DE BORTOLI, C. P., *Bacillus thuringiensis* - based biopesticides against agricultural pests in Latin America. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Org.). Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics. Rijeka: Intech, 682p. p. 445-462, 2012.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montecillo, v.2, p.1-10, 2003.

PORCAR, M.; GRENIER, A.M.; FEDERICI, B.; RAHBE, Y., Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4897–4900, 2009. DOI:10.1128/AEM.00686-09.

REYES, A.; CRUZ, M. A., Principales plagas de la palma aceitera in América Tropical: Manejo y control. Curso sobre palma aceitera, United Brands, Oil Palm Division, Costa Rica, 55p., 1986.

RIBEIRO, R. C.; LEMOS, W. P.; BERNARDINO, A. S.; BUECKE, J.; MÜLLER, A. A., Primeira ocorrência de *Alcaeorhynchus grandis* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) predando lagartas desfolhadoras do dendezeiro no estado do Pará. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 131-132, 2010.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; J. E. Y. H., *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 17, p. 547–59, 2007.

ROSAS-GARCÍA, N. M., Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugar cane borer, **Pest Management Science**, v. 62, p. 855–861, 2006.

ROSAS-GARCIA, N.M., Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. **Recent Patents on Biotechnology**, v.3, p. 28-36, 2009. DOI: 10.2174/187220809787172632.

SAENZ, A. A., OLIVARES, W., Speed of movement of first instar larvae of *Sagalassa valida* (Lepidoptera: Glyphipterigidae), **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 34, p. 57-61, 2008.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P., *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 283–300, 2011. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x.

SANCHIS, V., From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. **A review Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, p. 217-231, 2011.

SAS INSTITUTE. SAS/stat. User's guide, Version 8.02, TS level 2MO. 4th ed. Cary: SAS Institute, 2001. v.2.

SASAERILA, Y.; GRIES, R.; GRIES, G.; KHASKIM K. S.; BOO, T. C., Decadienoates: sex pheromone components of nettle caterpillars *Darna trima* and *D. Bradley*. **Journal Chemistry Ecology**, v. 26, p. 1969-1981, 2000.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LRERCLUS, D.; BAUM, J. R.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. H., *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, Washington, v. 62, p. 705–806, 1998.

SCHÜNEMANN, R., KNAAK, N., FIUZA, L. M., Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**, v. 2014, p. 1-12, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/135675>.

SERRÃO, J. E.; MARQUES-SILVA, S.; MARTINS, G. F., The rectum of *Oxaea flavencens* (Andrenidae) has a specialized structure among bees. **Micron**, Oxford, v. 35, p. 245-253, 2004.

SIEGEL, J.P., The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 77, p. 13-21, 2001.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C., Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-42, 2000.

SILVA, N., **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae***. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 40p., 2008.

SOBERON, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A., Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Science**, Morelos, v. 66, p. 1337 – 1349, 2009.

SWIECICKA, I.; BARTOSZEWICZ, M.; KASULYTE-CREASEY, D.; DREWNOWSKA, J.M.; MURAWSKA, E.; YERNAZAROVA, A.; LUKASZUK, E.; MAHILLON, J., Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 85, p. 262-272, 2013. DOI: 10.1111/1574-6941.12116.

TELLAM, R. L. The peritrophic matrix in Biology of the insect midgut: LEHANE, M. J., BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). London: Chapman e Hall, p. 86-108, 1996.

TERRA, W. R., Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Londres, v. 21, p. 675-734, 1996.

TINÔCO, R. S., **Diversidade de inimigos naturais associados a lepidópteros desfolhadores da palmeira do dendê, no Complexo Agroindustrial Agropalma no Pará, Amazônia Brasileira**. 46 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

VACHON, V., LAPRADE, R., SCHWARTZ, J. L., Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 11, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.05.001.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DE SOUZA, M. T., Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 1, p. 201-230, 1998.

Van FRANKENHUYZEN, K., Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 101, n. 1, p. 1-16, 2009. DOI: 10.1016/j.jip.2009.02.009.

Van FRANKENHUYZEN, K., Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 114, n. 1, p. 76-85, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>.

Van LENTEREN, J. C., Critérios de seleção de inimigos naturais a serem utilizados em programas de controle biológico. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras: UFLA, p. 1-19, 2000.

VEIGA, A. S.; FURLAN JÚNIOR, J.; KALTNER, F.J., Situação atual e perspectivas futuras da dendeicultura nas principais regiões produtoras: a experiência do Brasil. In: MÜLLER, A. A.; FURLAN JÚNIOR, J. (eds.). **Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 41-66, 2001.

VENTURIERI, A., Relação entre ocorrência do amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e variáveis ambientais no estado do Pará. In: **Simpósio brasileiro de sensoriamento remoto, 2009, Natal-RN. Anais XIV**, Natal: INPE, 25-30 abril, 2009, p. 523-530.

VILELA, E. F., MOURA, J. I., Pragas do coqueiro e palmeira de óleo. 2.ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 124p. 1998.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TEIXEIRA, A. A. C., CUNHA, F. M., COSTA, M. K. C. M., VEIGA, A. F. S. L., OLIVEIRA, J. V., Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthopetera: Romaleidae), **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 66, p. 1045-1049, 2006.

WOOD, B. J.; CORLEY, R. H. V.; GOH, K. H., Studies of effect of pests damage on oil palm yield. In: ISP Incorporated Society of Planters, Kuala Lumpur, INTERNATIONAL OIL PALM CONFERENCE, 19p, 1973.

ZHANG, Y.; MA, Y.; WAN, P. J.; MU, L.L.; LI, G.Q., *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 614-621, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC12413>.

ZEDDAM, J. L.; CRUZADO, J. A.; RODRIGUEZ, J. L.; RAVALLEC, M.; SUBILETE, E. C. A cypovirus from de South American oil palm pests *Norape argyrrhorea* and is potential as a microbial control agent. **Biocontrol**, Flórida, v. 48, p. 101-112, 2003.

ZORZENON, F.J., Principais pragas das palmeiras In: ALEXANDRE, M.A.V; DUARTE, L.M.L.; CAMPOS-FARINHA, A.E. C. (Eds.). Plantas ornamentais: doenças e pragas, São Paulo, p.207-247, 2008.