



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102024011040-4 A2

(22) Data do Depósito: 01/06/2024

(43) Data da Publicação Nacional:  
09/12/2025

(54) **Título:** MÉTODO DE CONTROLE DE SPODOPTERA FRUGIPERDA POR APLICAÇÃO DE BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI AOS OVOS DA PRAGA

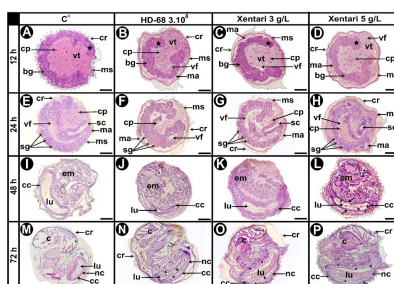
(51) **Int. Cl.:** A01N 63/23; A01P 7/04.

(52) **CPC:** A01N 63/23; A01P 7/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ.

(72) **Inventor(es):** FABIANA SANTANA MACHADO; BRUNO VINÍCIUS DAQUILA; RICARDO ANTÔNIO POLANCZYK; EDIMAR PETERLINI; HÉLIO CONTE.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE CONTROLE DE SPODOPTERA FRUGIPERDA POR APLICAÇÃO DE BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI AOS OVOS DA PRAGA. O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo da Agricultura e Saúde Animal, e fornece um método de controle de *S. frugiperda*, em sua fase embrionária (ovo), utilizando esta bactéria *B. thuringiensis*. Diante da importância desta espécie e a busca por uma agricultura mais sustentável e economicamente viável, com o presente método proposto é possível realizar a redução populacional de *S. frugiperda* antes que ela atinja sua fase larval, evitando quaisquer danos as plantas, principalmente nas plantações de milho.



## **MÉTODO DE CONTROLE DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* POR APLICAÇÃO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* AIZAWAI AOS OVOS DA PRAGA**

### **INTRODUÇÃO**

[001] O presente pedido de patente de invenção compreende um método de controle de *S. frugiperda* em seu desenvolvimento embrionário através do uso de *B. thuringiensis*.

### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

[002] A principal aplicação da tecnologia é na área da Agricultura e Saúde Animal, principalmente no controle da praga da espécie *S. frugiperda* em sua fase embrionária (ovo), utilizando a bactéria *B. thuringiensis*.

### **ESTADO DA TÉCNICA**

[003] Dentro do sistema de Manejo Integrado de Pragas (MIP), estratégias de controle são utilizadas como forma de reduzir os prejuízos causados pelas pragas. Dentre elas, o uso da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, na forma de bioinseticidas, mostrou excelentes resultados no controle de insetos alvo em suas fases larvais. Essa bactéria tem como característica a formação de esporos, e a produção de proteínas inseticidas, formadas por cristais durante sua fase de esporulação, conhecidas como proteínas inseticidas Cry. Essas proteínas apresentam a característica de serem altamente específicas para seu inseto alvo. *B. thuringiensis* é uma importante ferramenta no controle de lepidópteros-praga, como a *Spodoptera frugiperda*, inseto capaz de ocasionar perdas de produtividade em torno de 17% a 38% em várias culturas agrícolas, principalmente na cultura do milho. Deve-se destacar que esta praga invadiu os continentes Africano e Asiático recentemente, sendo considerada pela FAO uma ameaça à segurança alimentar nestes locais. Para realização do monitoramento desta praga em áreas de cultivo, o agricultor realiza a contagem do número de plantas atacadas pelas lagartas, para a determinação do nível de dano que indicará a necessidade ou não de aplicar os produtos para o controle. No entanto, este método só detecta o inseto quando ele já se encontra causando injúrias às plantas.

[004] O documento WO2018067815, refere-se as composições que incluem um novo *Bacillus thuringiensis* cepa designada RTI545 para uso em benefício do crescimento das plantas e controlar pragas de plantas. Em particular, a cepa RTI545 é útil para controlar nematoides de plantas, pragas de insetos e fungos. As composições incluem sementes de plantas revestidas com a cepa RTI545. As composições podem ser aplicadas sozinhas ou em combinação com outros agentes microbianos, biológico ou inseticidas químicos, fungicidas, nematicidas, bactericidas, herbicidas, extratos de plantas, reguladores de crescimento de plantas ou fertilizantes. Por exemplo, o aumento do crescimento e o controle de insetos são proporcionados por entregar na hora do plantio uma combinação de um produto químico inseticida como bifentrina e um fertilizante líquido para plantas ou sementes tratado com RTI545.

[005] O documento WO9213941 informa que novos isolados bacterianos de *B. thuringiensis* estão apresentando maior toxicidade em relação a insetos anteriormente resistentes ou insuficientemente suscetíveis espécies, incluindo, mas não limitado a *Plutella xylostella*, *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera exigua*, bem como certas pragas secundárias, como *Trichoplusia ni*. Tais isolados podem ser caracterizados pela posse de um subconjunto específico de genes que codificam vários *B. thuringiensis* proteínas delta-endotoxina e por um perfil plasmídico característico, ou matriz, conhecido por estar associado a ele. Também é divulgado um método para a identificação eficiente de tais isolados bacterianos utilizando métodos generalizados ou, alternativamente, sondas de DNA específicas de genes; nucleotídeo clonado ou sintetizado sequências que são úteis na preparação dessas sondas; composições contendo uma quantidade eficaz como inseticida de um agente bacteriano isolado da invenção em combinação com um veículo aceitável; e um método para seu uso no controle ou erradicação de pragas de insetos.

[006] O documento “*Insecticidal toxins of bacillus thuringiensis*”, Lüthy, P. 1980, referem-se as conclusões da EFSA após a revisão pelos pares do risco inicial, avaliações realizadas pelas autoridades competentes do Estado-Membro relator os Países Baixos e Membro co-relator Declarar a Alemanha para a substância ativa do

pesticida *Bacillus thuringiensis* ssp. cepa aizawai ABTS-1857 e as considerações a respeito da inclusão da substância no anexo IV do Regulamento (CE) n.º 396/2005 são relatados. O contexto da revisão por pares foi o exigido por Regulamento de Execução (UE) n.º 844/2012 da Comissão, alterado pelo Regulamento de Execução (UE) 2018/1659 da Comissão. As conclusões foram alcançadas com base na avaliação dos usos representativos de *Bacillus thuringiensis* ssp. aizawai cepa ABTS1857 como inseticida em hortaliças frutíferas (pimenta, campo e usos em estufa). Os pontos finais confiáveis, apropriados para uso em avaliação de risco regulatório, são apresentados.

[007] O documento CN112695001B, pertence ao campo dos pesticidas biológicos e refere-se a uma cepa de *Bacillus thuringiensis* que apresenta alta toxicidade contra pragas Noctuidae e sua aplicação. A invenção envolve *Bacillus thuringiensis* NBI-616, que apresenta alta toxicidade contra diversas pragas Noctuidae. A cepa foi depositada no *China Type Culture Collection Center* (CCTCC) com o número de depósito CCTCC NO: M 2020771. Os bioensaios mostram que *Bacillus thuringiensis* NBI-616 tem alta toxicidade contra as larvas de *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*, algodão lagarta e traça-diamante. Um pó bruto com alto teor de *Bacillus thuringiensis* NBI-616 foi preparado usando processo convencional de fermentação-centrífuga concentração-secagem por pulverização. A cepa envolvida na presente invenção pode ser usada para desenvolver pesticidas microbianos para controlar pragas Noctuidae.

#### OBJETIVOS E VANTAGENS DA INVENÇÃO

[008] O objetivo da invenção é realizar um método para a redução populacional da praga *S. frugiperda*, garantindo assim o controle a essa ameaça à segurança alimentar.

[009] A vantagem desta invenção é o controle da lagarta *S. frugiperda*, antes que ela inicie os danos a cultura. Diante da importância desta espécie e a busca por uma agricultura mais sustentável e economicamente viável, este método descreve o uso

de *B. thuringiensis* no controle de *S. frugiperda* em seu desenvolvimento embrionário (ovo).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS E INVENÇÃO

[010] A Figura 1 demonstra a microscopia de luz dos ovos controle e tratados de *Spodoptera frugiperda*, 12, 24, 48 e 72 horas após bioensaios. **(A, E, I e M)**. Ovos controle positivo ( $C^+$ ), **(B, F, J e N)** tratados com Bt *aizawai* HD-68 em concentração  $3.10^8$  esporos/mL, **(C, G, K e O)** tratados com Xentari® em concentração 3 g/L e **(D, H, L e P)** 5 g/L. Ovos com 12 horas possuem externamente cório (cr), e o interior preenchido por vitelo (vt). No vitelo estão presentes células primordiais (cp), vitelófagos (vf) e bandas germinativas (bg). Na banda germinativa é possível observar a região de lóbulo cefálico (estrela negra). Abaixo do cório estão presentes as membranas extraembrionárias, serosa (ms) e amniótica (ma). Com 24 horas, ocorre o desenvolvimento de segmentações (sg) e do sulco gástrico (sc). Em 48 horas é possível observar no embrião (em) a região intestinal, formada por células colunares (cc) e lúmen (lu) evidente. Aqui, os ovos tratados com Xentari® na concentração de 5,00 g/L demonstram células colunares com vacuolizações (►) e algumas degeneradas (\*) e regiões com espaçamento (→). Com 72 horas os embriões estão completamente desenvolvidos, sendo possível observar a cabeça (c); todos os tratamentos com Bt desse horário possuem comprometimento do epitélio intestinal formado por células colunares, núcleos (nc) evidentes, vacuolizações citoplasmáticas e degenerações celulares. Barras de escala em A-P= 10 µm.

[011] Na Figura 2, mostram as imagens obtidas através de Microscopia eletrônica de varredura dos ovos de *Spodoptera frugiperda*. **A, C, E, F e H)** Ovos controle positivo ( $C^-$ ). **B e D)** Ovos tratados com solução Xentari® na concentração 3.00 g/L, **G)** Xentari® na concentração 5.00 g/L, e **I)**  $3.10^8$  esporos/mL de Bt *aizawai* HD-68. Em **(A e B)** observamos que os ovos possuem formato esférico, com região de roseta (rr) evidente, e no centro dessa, a micrópila (mp). **(B)** A micrópila possui diâmetro próximo aos 6 µm. **(E, F e G)** Na superfície dos ovos estão presentes esculturas coriônicas (ec) e nelas aberturas circulares, as aeropilas (ae), as aeropilas estão a uma

distância que varia entre 135,2 e 148,9  $\mu\text{m}$  da micrópila e possuem diâmetro variando entre 1.026 e 2.296  $\mu\text{m}$ . Em **(B, D, G e I)** são observados apenas esporos do Bt utilizado nos bioensaios. **(D)** Os esporos estão próximos da micrópila (mp) e **(G e I)** aeropilas (ae); demonstram diâmetro que varia entre 1.050 e 1.850  $\mu\text{m}$ , acumulando-se principalmente entre as esculturas coriônicas (ec). As aeropilas possuem diâmetro que varia entre 1.650 e 2.294  $\mu\text{m}$ . Barras de escala em A-I= 20  $\mu\text{m}$ .

[012] A Figura 3 mostra a inviabilidade de ovos de *Spodoptera frugiperda* tratados com diferentes concentrações do produto comercial Xentari® e da cepa HD-68 após 72 horas de bioensaio. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, testes;  $P < 0,05$ ). Na Figura 3 pode-se observar que o tratamento de Xentari® em sua dose mínima, média e máxima se diferiram significativamente do tratamento controle, apresentando uma inviabilidade de ovos de 26,50%, 35% e 40,50% respectivamente.

[013] A Figura 4 mostra a mortalidade de larvas de *Spodoptera frugiperda* após sua eclosão de ovos tratados com diferentes concentrações do produto comercial Xentari® e da cepa HD-68. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, testes;  $P < 0,05$ ). Ainda na Figura 4 observa-se que mesmo tendo eclodido, as larvas tiveram uma mortalidade elevada nas primeiras 24 horas em todos os tratamentos com *Bacillus thuringiensis*, diferindo do tratamento controle, o que reforça os danos ocasionados no embrião. E no período de 168 horas os tratamentos com a cepa HD-68 na concentração de  $3 \times 10^8$  e Xentari® em sua dose mínima, média e máxima apresentaram mortalidade de 90%, 96%, 95% e 95% respectivamente.

### **Ovos de *S. frugiperda***

[014] Lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas no campo, no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP), a criação foi estabelecida até sua décima geração, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial proposta por Greene et al. (1976), com modificações (sem adição de antibióticos) até a pupação. Para os adultos foram montadas gaiolas de acasalamento com tubo de policloreto de

vinila (PVC) de 120 mm, tecido do tipo Voil foi utilizado para cobrir a parte superior do tudo e os insetos foram alimentados com solução de mel a 10% (v/v). O interior do tubo foi forrado com folhas de acetato A4 transparentes. Para realização dos bioensaios é necessário que as posturas sejam realizadas em substrato inerte, como plástico ou vidro, pois ele entrará em contato com os produtos aplicados, e materiais não inertes podem interagir e alterar sua toxicidade. Folhas de acetato contendo massas de ovos de *S. frugiperda* com idade entre 0-24 horas foram coletadas e em seguida foi realizada uma padronização mantendo 20 ovos por massa.

### **Bioensaio**

[015] Neste estudo foi utilizado o produto comercial Xentari®, formulado por ABBOTT LABORATORIES Chemical & Agricultural Products Division North Chicago, IL 60064-USA e registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 00599. O produto é formulado por *B. thuringiensis aizawai* (Bt *aizawai*) (540 g/kg; 54% m:m [10% equivalente de proteínas inseticidas]) e outros ingredientes (460 g/kg; 46% m:m).

[016] Além do produto comercial, também foi utilizada a cepa Bt *aizawai* HD-68, obtido a partir de coleção própria do LCMAP. O meio de cultura ágar nutriente (Kasvi®), foi utilizado como substrato, e preparado com 23,0 gramas do Nutrient Agar® dissolvidos em 1 litro de água destilada e autoclavado a 1 atm. por 20 minutos. Após atingir temperatura de 45°C, ponto em que o meio ainda não solidifica, este foi vertido em placas de Petri (90 x 15 mm [diâmetro: altura]). Após solidificação do meio, foi inoculada uma alíquota de 5,0 µL da suspensão contendo a cepa Bt *aizawai* HD-68 no centro da placa de Petri. Essa alíquota foi espalhada na superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas inoculadas foram mantidas em incubadora B.O.D. por um período de sete dias, nas condições favoráveis ao desenvolvimento do Bt, com temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12:12 h (L:E).

[017] Para a contagem dos esporos foram raspadas as colônias que se desenvolveram no meio de cultura. O material coletado foi transferido para tubos

Falcon® com 10 mL de água estéril. Essa suspensão foi homogeneizada com auxílio de um agitador (Phoenix® Modelo AP56) por 60 segundos e 500 µL foram retirados para contagem dos esporos em câmara de Neubauer em microscópio ótico Zeiss®.

[018] Nos bioensaios foram utilizadas três concentrações do produto comercial Xentari®: 3,00, 4,25 e 5,00 g/L. Estas concentrações foram baseadas nas especificações do fabricante para o controle de *S. frugiperda*. Além do produto comercial, foi realizada uma padronizada única, na concentração de  $3.10^8$  esporos/mL<sup>-1</sup>, da suspensão de Bt *aizawai* HD-68. Ambos (produto comercial e suspensão), foram diluídos em solução 0,05% Tween® 80, apenas no momento dos bioensaios.

[019] Os bioensaios foram realizados conforme descrito por Daquila et al. (2021). Massas ovos de *S. frugiperda* foram mergulhadas por 30 segundos nas respectivas soluções. Após, as massas de ovos tratadas foram armazenadas em placas de Petri (60 x 15 mm [diâmetro: altura]), forradas com papel filtro e reservadas em incubadora B.O.D., com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, umidade de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12:12 h (L:E). Como controle negativo (C<sup>-</sup>) foi utilizada a solução 0,05% Tween® 80, e como controle positivo (C<sup>+</sup>), água destilada autoclavada. Cada tratamento consistiu em 10 repetições, com 20 ovos cada (n= 200 por tratamento). Observações foram realizadas a cada 24 horas após bioensaios, em microscópio Olympus CX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão) em aumento de 40x e utilizando a câmera AxioCam MRc 5 e o software Zen 3.4 (Blue Edition). A inviabilidade dos ovos foi avaliada ao final de 72 horas.

### **Viabilidade larval**

[020] Lagartas neonatas de *S. frugiperda* que eclodiram dos ovos após o período de 72 horas foram coletadas de todos os tratamentos. Após contagem e obtenção de um número mínimo de indivíduos, estas foram individualizadas em recipientes de 25 mm de diâmetro com fundo preenchido por dieta artificial. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e consistiu em 5 repetições com 20 lagartas neonatas cada (n= 100 por tratamento). Os recipientes foram mantidos

em incubadora B.O.D., com temperatura de  $25\pm 2$  °C, umidade de  $70\pm 10\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas (L:E). A mortalidade foi avaliada a cada 24 horas pelo período de 7 dias após eclosão, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentaram movimento.

### **Análises histológicas**

[021] Os ovos não tratados com Bt e tratados foram coletados 12, 24, 48 e 72 horas após bioensaios e processadas conforme descrito por Daquila et al. (2021). Os ovos foram fixados em solução Bouin alcoólico (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético [7,5:2,5:0,5] [v/v]), por 24 horas e temperatura ambiente. Após, foi realizada a desidratação em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100% [v/v]), diafanização em xilol e infiltração em Paraplast® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Cortes semifinos de seis micrômetros foram obtidos em Micrótomo Leica RM 2250 (Leica Biosystems) e corados com Hematoxilina e Eosina (H/E) (Junqueira e Junqueira, 1983). As imagens foram analisadas em microscópio Olympus CX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão) e capturadas utilizando a câmera AxioCam MRc 5 e o software Zen 3.4 (Blue Edition).

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

[022] Os ovos não tratados com Bt e tratados foram coletados 24 e 96 horas após bioensaios e processadas conforme descrito por Daquila et al. (2021). Os ovos foram fixados em solução Bouin alcoólico (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético [7,5:2,5:0,5] [v/v]), por 24 horas e temperatura ambiente. Após, foi realizada a desidratação em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100% [v/v]), submetidas ao ponto crítico Leica® EM CPD030 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), metalizadas com pó de ouro (Shimadzu IC-50, Kyoto, Japão) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 (FEI Company, Eindhoven, Holanda), no Centro de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

## REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE CONTROLE DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*, através da utilização de *Bacillus thuringiensis* subespécie Aizawai, **caracterizado pela** diluição de 3 a 5g/L da formulação composta por *B. thuringiensis* subespécie Aizawai em água deionizada, com volume de calda utilizado de 100L/ha e aplicação da solução em fase embrionária (ovo) da *S. frugiperda*.

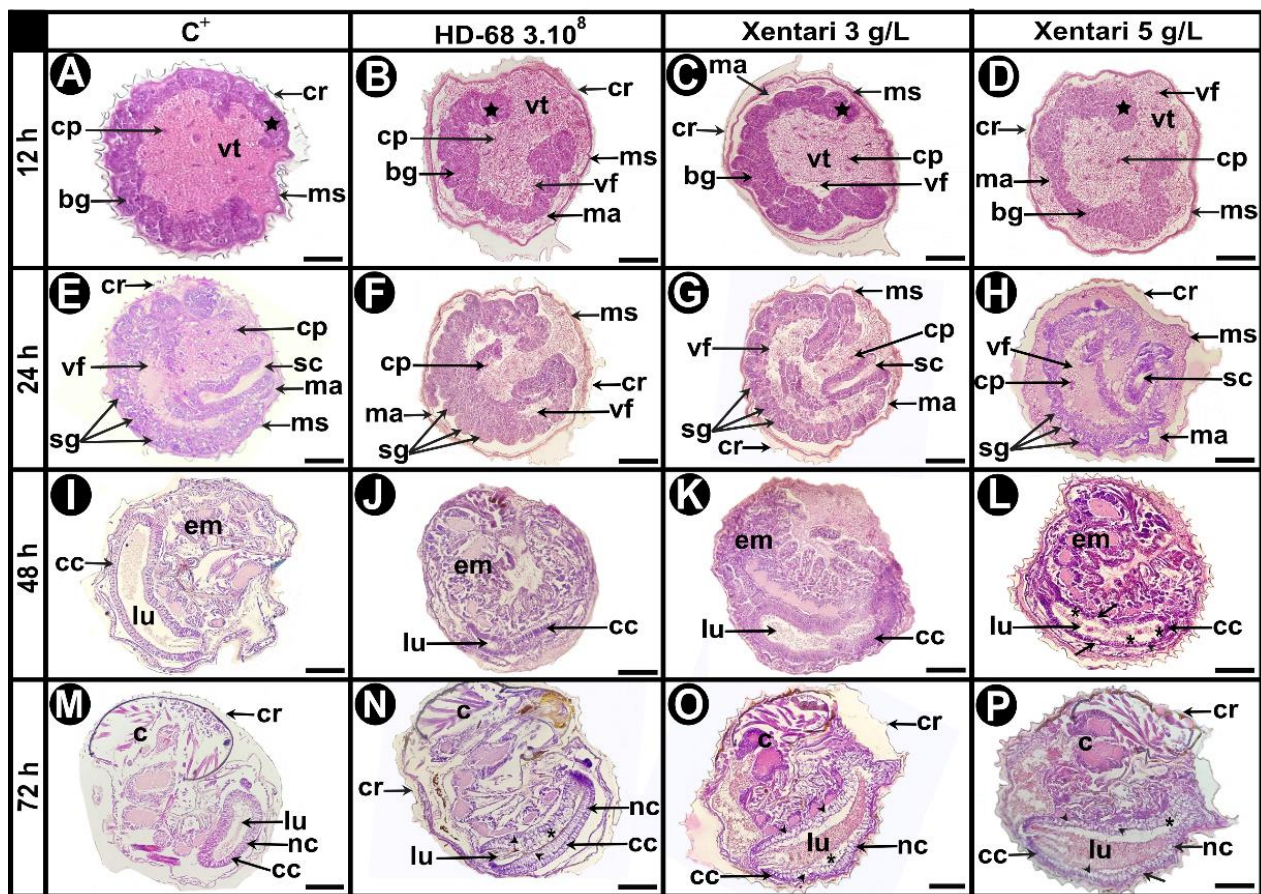


FIGURA 1

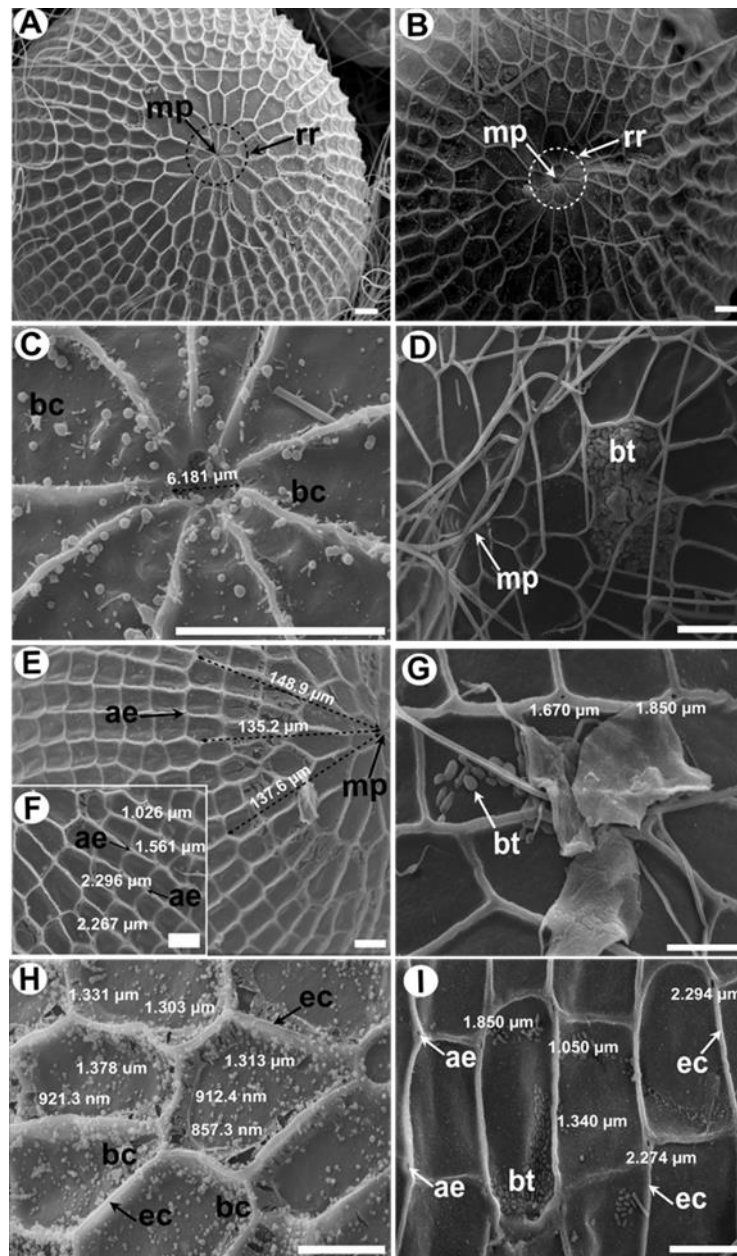


FIGURA 2

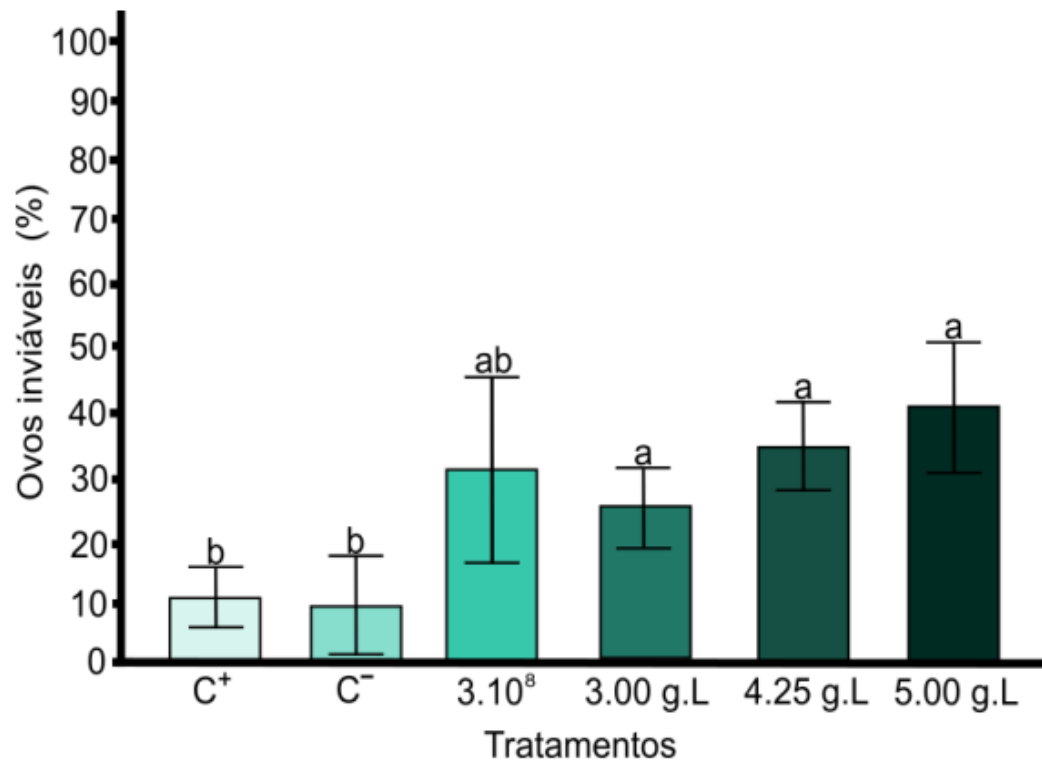


FIGURA 3

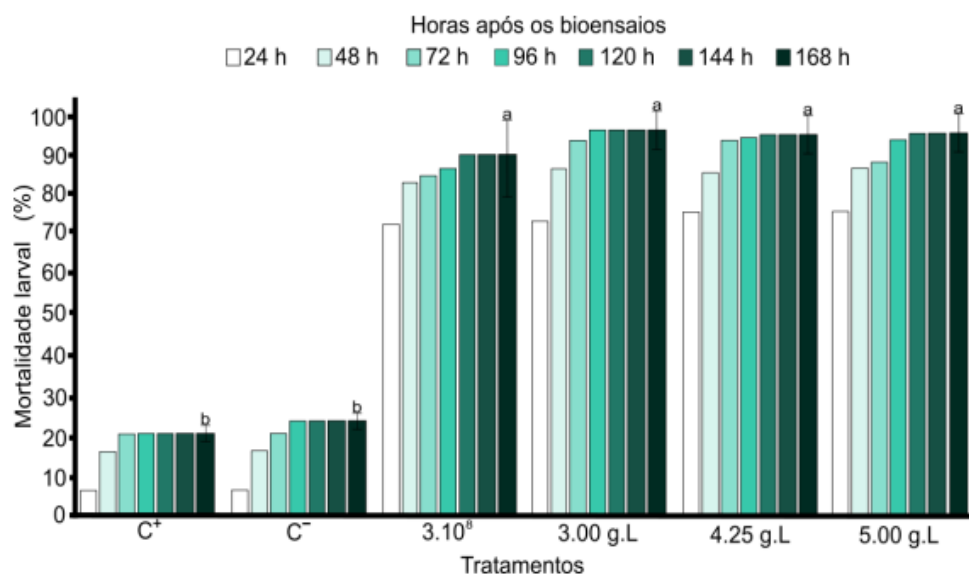


FIGURA 4

**RESUMO****MÉTODO DE CONTROLE DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* POR APLICAÇÃO DE *BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI* AOS OVOS DA PRAGA**

O presente pedido de patente de invenção, pertencendo ao campo da Agricultura e Saúde Animal, e fornece um método de controle de *S. frugiperda*, em sua fase embrionária (ovo), utilizando esta bactéria *B. thuringiensis*. Diante da importância desta espécie e a busca por uma agricultura mais sustentável e economicamente viável, com o presente método proposto é possível realizar a redução populacional de *S. frugiperda* antes que ela atinja sua fase larval, evitando quaisquer danos as plantas, principalmente nas plantações de milho.