

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE DE FORMULAÇÕES  
MICROENCAPSULADAS DE *Bacillus thuringiensis* EM  
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO, NA CULTURA  
DA SOJA (*Glycine max* (L.)), PARA *Spodoptera frugiperda*  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Adrieli Fernanda Casado**  
Engenheira Agrônoma

**D  
I  
S  
S  
.  
/  
C  
A  
S  
A  
D  
O  
  
A  
.  
F  
.  
  
2  
0  
2  
4**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ATIVIDADE DE FORMULAÇÕES  
MICROENCAPSULADAS DE *Bacillus thuringiensis* EM  
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO, NA CULTURA  
DA SOJA (*Glycine max* (L.)), PARA *Spodoptera frugiperda*  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Discente: Eng. Agr. Adrieli Fernanda Casado**

**Orientador: Prof. Dr. Jhones Luiz de Oliveira**

**Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk**

Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

C334a

Casado, Adrieli Fernanda

Atividade de formulações microencapsuladas de *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório e campo, na cultura da soja (*Glycine max* (L.), para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Adrieli Fernanda Casado. -- Jaboticabal, 2024

73 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jhones Luiz de Oliveira

Coorientador: Ricardo Antonio Polanczyk

1. Entomologia. 2. Microencapsulação. 3. Insetos. 4. Pragas agrícolas. 5.

Soja. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ATIVIDADE DE FORMULAÇÕES MICROENCAPSULADAS DE *Bacillus thuringiensis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO, NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.), PARA *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

**AUTORA: ADRIELI FERNANDA CASADO**  
**ORIENTADOR: JHONES LUIZ DE OLIVEIRA**  
**COORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
**JHONES LUIZ DE OLIVEIRA**  
Data: 19/03/2024 17:11:16-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. JHONES LUIZ DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Ambiental / ICT UNESP Sorocaba - Credenciado no PPGEA

Profª. Drª. ESTEFÂNIA VANGELIE RAMOS CAMPOS (Participação Virtual)  
Universidade Federal do ABC (UFABC)

Documento assinado digitalmente  
**ESTEFANIA VANGELIE RAMOS CAMPOS**  
Data: 20/03/2024 15:53:13-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Virtual)  
Departamento de Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
**GUILHERME DUARTE ROSSI**  
Data: 21/03/2024 16:07:45-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 19 de março de 2024

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Adrieli Fernanda Casado** – Natural de Dracena, SP, nascida em 05 de março de 1994, filha de Márcio Casado e Gilvana Casado. Formada no ano de 2019 em Engenharia agrônômica, pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita filho” – Câmpus de Dracena/SP. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com microbiologia fúngica sob orientação do Prof. Dr. Diego Cunha Zied, por 3 anos. Realizou trabalhos focados em econômica rural sob orientação da Prof. Dra. Elaine Mendonça Bernardes, o qual recebeu prêmio de melhor iniciação científica da faculdade, tendo sido financiado pela FAPESP. Participou efetivamente da empresa júnior da universidade (GERUD), além de ter sido monitora da disciplina de bioquímica, junto ao Prof. Dr, Fábio Herminio Mingatto. No final do curso, o estágio foi realizado na empresa BRACELL, no setor de Pesquisa e Desenvolvimento. Em agosto de 2020 iniciou o curso de mestrado no programa de Pós graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal, São Paulo, desenvolvendo pesquisas no laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, em parceria com o laboratório de nanotecnologia Environmental Nanotechnology Grulp, sob a orientação do Prof. Dr, Jhones Luiz de Oliveira, e Co-orientação de Ricardo Antônio Polanczyk.

**Dedico**

Aos meus pais

Márcio e Gilvana

Ao meu irmão Lucas

Por sempre estarem ao meu lado, por todo apoio e pelo amor incondicional

**Ofereço**

aos meus avós Edina e Francisco, por todo amor que me foi dado

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me apoiar, e nunca me deixar cair;

Aos meus pais, Márcio Casado e Gilvana Casado, por todo seu apoio, união, carinho e zelo.

Ao meu irmão Lucas Casado, por todo carinho, proteção e conselhos.

Ao Prof. Dr, Jhones Luiz de Oliveira, pela valiosa orientação, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas, e por compartilhar sua atenção, mesmo em momentos que devido a questões pessoais que exigiam muito, acabava me dando mais do que podia, sou muito grata.

Ao Prof. Dr, Ricardo Antonio Polancyk, por todos os ensinamentos, todos os conselhos, que foram de grande valia.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP/FCAV pela oportunidade de realizar o curso.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Entomologia Agrícola, e aos professores convidados, pelos conhecimentos transmitidos ao decorrer do curso.

Aos Professores Doutores Guilherme Duarte Rossi e Renata Lima, por comporem a banca do exame Geral de Qualificação e contribuírem pela melhoria do trabalho.

Aos amigos, Juliana Silva Queiroz, Natália Dalóia Danzi, Ramon Vasconcelos, Sandy Fonseca, Kelly Cristina Gonçalves, Amanda Guimarães, Ana Zero, Ciro Pedro, Claudiane Rocha, João Rafael Pompeu, Gilciane Bragagnolo e Beatriz Spadoni.

Em especial a Joacir Nascimento, por todos os ensinamentos na área, pela ajuda no experimento, por todos os conselhos e por sempre estar disposto a me ajudar.

Ao Dr, Marcelo Muller, por todos os ensinamentos passados, em relação a estatística.

Ao Environmental de Nanotechnology Group, laboratório da UNESP de Sorocaba, por fornecerem as formulações.

A todos os funcionários e demais estudantes de Pós Graduação em Entomologia Agrícola – Unesp Jaboticabal.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



E as demais pessoas, que direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho possível.  
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais</b> .....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A cultura da soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill) .....	3
2.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) .....	4
2.3. Controle para <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	5
2.4. Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> no manejo de pragas .....	6
2.5. Limitações no uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
2.6. Encapsulamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
REFERÊNCIAS .....	9
<b>CAPÍTULO 2 – Mortalidade de lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith) (Lepidóptera: Noctuidae), submetidas a formulações biológicas microencapsuladas, em laboratório</b> .....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1 População de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	24
2.2 Preparo das formulações de micropartículas .....	24
2.3 Bioensaios de patogenicidade .....	25
3. RESULTADOS .....	27
4. DISCUSSÃO .....	29
5. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS .....	31
<b>CAPÍTULO 3 – Persistência de <i>Bacillus thuringiensis</i> berliner, 1911 microencapsulado na cultura da soja e avaliação da mortalidade em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith) (Lepidóptera: Noctuidae)</b> .....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.1. População de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	42
2.2. Condução das plantas de soja.....	42
2.3. Preparo da calda das formulações .....	43
2.4. Aplicação das formulações.....	44
2.5. Coleta de material para avaliação .....	45

2.6. Teste de mortalidade de <i>S. frugiperda</i> em condições de campo.....	46
2.7. Contagem de Esporos.....	48
2.8. Análise estatística .....	48
3. RESULTADOS .....	48
3.1 Resultados mortalidade <i>S. frugiperda</i> e contagem de esporos.....	48
4. DISCUSSÃO .....	51
5. CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS .....	52
CAPÍTULO 4 – Considerações finais.....	60

**ATIVIDADE DE FORMULAÇÕES MICROENCAPSULADAS DE *Bacillus thuringiensis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CAMPO, NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.), PARA *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**RESUMO** - A *Spodoptera frugiperda*, é uma praga de grande importância mundial. Tem rápida capacidade de disseminação e também, rápida capacidade de evolução de resistência. Atualmente, seu controle é realizado através de inseticidas químicos, e plantas geneticamente modificadas, ambas as táticas de controle apresentam limitações. O controle biológico, através de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, tem se mostrado uma ferramenta eficaz, porém, apresentam elevada sensibilidade a fatores climáticos, que podem reduzir sua eficiência. Uma das formas de contornar essa limitação, é através do uso de técnicas de encapsulamento. Portanto, o trabalho teve como objetivo obter formulações a base de *Bacillus thuringiensis* microencapsuladas com aumento de persistência em função do tempo. As formulações foram obtidas através da técnica de spray-dryer. Foram testadas diferentes formulações a base de *Bacillus thuringiensis* aizawai (Xentari®) e *Bacillus thuringiensis* kurstaki (Dipel®), encapsuladas, e não encapsuladas, em lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Para as formulações encapsuladas, foi utilizado um polissacarídeo como material de parede e a lignina e ácido húmico utilizados como materiais fotoprotetores. Para avaliação de eficiência, foram realizados testes de patogenicidade em condições de laboratório e persistência em condições de semi-campo. As formulações contendo a mistura de *Bacillus thuringiensis* aizawai e *Bacillus thuringiensis* kurstaki encapsulados apresentaram resultados eficientes em condições de laboratório e maior residual em situação de semi-campo, quando comparados as mesmas formulações não encapsuladas. As formulações contendo *Bacillus thuringiensis* aizawai encapsulado demonstrou maior performance nos ensaios persistência em condição de semi-campo quando comparado ao não encapsulado. Ademais a adição de ácido húmico como agente protetor UV também contribuiu para o aumento de persistência. Os resultados indicam que a microencapsulação, bem como adição de compostos com atividade protetora UV podem contribuir para o aumento de persistência de formulações de *Bacillus thuringiensis*.

**Palavras chave:** controle biológico, lagarta do cartucho, persistência

**ACTIVITY OF MICROENCAPSULATED FORMULATIONS OF *Bacillus thuringiensis* IN LABORATORY AND FIELD CONDITIONS, IN SOYBEAN CROPPING (*Glycine max* (L.), FOR *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE))**

**ABSTRACT** - *Spodoptera frugiperda* is a pest of great global importance. It has rapid dissemination capacity and also rapid resistance evolution capacity. Currently, its control is carried out through chemical insecticides and genetically modified plants, both control tactics have limitations. Biological control, through bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis*, has proven to be an effective tool, however, they are highly sensitive to climatic factors, which can reduce their efficiency. One of the ways to get around this limitation is through the use of encapsulation techniques. Therefore, the aim of the work was to obtain microencapsulated *Bacillus thuringiensis*-based formulations with increased persistence over time. The formulations were obtained using the spray-dryer technique. Different formulations based on *Bacillus thuringiensis* aizawai (Xentari®) and *Bacillus thuringiensis* kurstaki (Dipel®), encapsulated and non-encapsulated, were tested on *Spodoptera frugiperda* caterpillars. For the encapsulated formulations, a polysaccharide was used as a wall material and lignin and humic acid were used as photoprotective materials. To evaluate efficiency, pathogenicity tests were carried out under laboratory conditions and persistence under semi-field conditions. The formulations containing a mixture of encapsulated *Bacillus thuringiensis* aizawai and *Bacillus thuringiensis* kurstaki did not show efficient results in laboratory or semi-field conditions, when compared to the same non-encapsulated formulations. However, formulations containing encapsulated *Bacillus thuringiensis* aizawai demonstrated greater performance in persistence tests in semi-field conditions when compared to non-encapsulated ones. Furthermore, the addition of humic acid as a UV protective agent also contributes to increased persistence. The results indicate that microencapsulation, as well as the addition of compounds with UV protective activity, can contribute to increasing the persistence of *Bacillus thuringiensis* formulations.

**Keywords:** biological control, fall armyworm, persistence

## CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

### 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga que ameaça a economia mundial. Além de possuir o hábito polífago, com 353 plantas hospedeiras registradas, tem apresentado rápida disseminação, desde as Américas para mais de 70 países, e também rápida capacidade de evolução da resistência, segundo Arthropod Pesticide Resistance Database, há relatos de mais de 140 casos de resistência de *Spodoptera frugiperda* a 40 ingredientes ativos diferentes (Montezano, 2018; FAO; 2022, Edosa, 2021).

No atual cenário da agricultura, o controle dessa praga é realizado com o uso de inseticidas químicos e cultivares geneticamente modificadas, que expressam genes da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Ambas as táticas de controle têm limitações quanto a sua eficiência (Tabashinik, 1994; Paredes-Sánchez, 2021).

O controle químico, por sua vez, quando não gerenciado de forma correta, além de selecionar populações resistentes, pode também afetar negativamente o meio ambiente e a saúde humana. Além disso, a União Europeia, um dos maiores importadores de milho do Brasil, tem diminuído os seus valores de LMR (Limite Máximo de Resíduos), que consiste na concentração máxima de resíduos químicos em determinado produto, para que a entrada em seu país de destino seja permitida. Essa questão poderá levar o produtor a buscar alternativas para o manejo de pragas (Hawkins; 2019, Ipea, 2021; European Commission, 2022).

Neste sentido, uso de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis*, se destaca como uma ferramenta eficiente para o controle de pragas, com baixo teor de resíduos nos alimentos, baixa toxicidade ao ecossistema e lenta seleção de indivíduos resistentes, contribuindo para uma agricultura sustentável. Além dessas vantagens, a bactéria *Bacillus thuringiensis* pode também ser utilizada em áreas de cultivos geneticamente modificados, desde que não tenha resistência cruzada entre as proteínas Cry do bioinseticida Bt e aquelas expressas na planta Bt (Chattopadhyay, 2017; Bock, 2021; Glare, 2012; Jakka et al., 2014; Horikoshi et al., 2019).

No entanto, apesar de ser uma importante ferramenta de controle, os Bt bioinseticidas possuem elevada sensibilidade a fatores climáticos. Dentre eles podemos destacar a radiação ultravioleta (UV), temperatura elevada, e baixa umidade relativa do ar, que interferem na viabilidade e reduzem a persistência dos Bt bioinseticidas. Esses fatores podem aumentar o custo de produção para os agricultores, visto que, ao reduzirem a persistência de bioinseticidas a base de Bt resultam em um menor controle de pragas, implicando na necessidade de outras aplicações (Leong et al. 1980; Glare et al. 2012, Lacey et al. 2015).

Dentre os fatores citados, um dos que mais afetam a persistência desses bioinseticidas no campo é a radiação ultravioleta (UV). Pozsgay et al. (1987) ao analisar o mecanismo de fotodegradação do cristal de Bt *kurstaki* constatou a quebra de 30% das cadeias do triptofano e 20% histidina decorrentes da radiação solar contínua por 48 horas. É importante ressaltar que a destruição do triptofano, pode trazer graves alterações na configuração tridimensional da proteína inseticida Cry e consequente perda de sua atividade biológica (Ignoffo, 1977; Cohen et al., 1991; Zhang, 2008).

Porém, uma maneira de aumentar a persistência de Bt bioinseticidas é o uso de técnicas de encapsulamento. O encapsulamento pode aumentar a persistência do bioinseticida, devido a proteção do microrganismo, fornecendo um microambiente benéfico ao mesmo, e protegendo o agente de controle biológico de condições adversas do ambiente exterior e do estresse mecânico, consequentemente, aumentando a atividade biológica sobre as pragas alvo (Paula et al., 2011; Vemmer e Patel, 2013; Paulo e Santos, 2017; Lade et al., 2019; De Oliveira, 2021).

O processo de encapsulamento pode ser realizado através de várias metodologias, e matrizes. Apesar do número variado de técnicas e material de parede, para determina-los, é necessário levar em consideração parâmetros como o tipo e característica do microrganismo, compatibilidade do material de parede com o ingrediente ativo, qual será a aplicação do organismo encapsulado e o objetivo do encapsulamento. As matrizes de origem natural, são um destaque, por apresentarem baixo custo, biocompatibilidade e baixo impacto ambiental. Dentre as técnicas

disponíveis, a de sprai-driyng apresenta vantagens como baixo custo, rapidez em seu processo, e não necessita de lavagens para a eliminação de resíduos ou solventes (O'Sullivan et al., 2019; Campos et al., 2019; Vassilev, 2020).

Frente a essas questões, a pesquisa objetivou testar o potencial de substâncias protetoras a radiação UV para aumentar a persistência de formulações a base de *Bacillus thuringiensis* e avaliar a eficiência de controle sobre a *Spodoptera frugiperda*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

A soja (*glycine max* (L.) Merrill) é originária da Ásia, mais precisamente do nordeste da China, região que também é conhecida como Manchúria (Hymowitz, 1970). É considerada uma das culturas mais antigas e chegou ao Ocidente entre final do século XV e início do XVI (Harlan, 1975).

Pertence a ordem de plantas Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae (Judd et al., 2009; Lewis et al., 2005), é uma cultura herbácea anual, com germinação epígea da semente, com ciclo de vida (emergência a maturação) de 70 a 200 dias, altura da inserção da primeira vagem, de 10 cm a 20 cm e da planta de 30 cm a 250 cm, o hábito de crescimento é ereto e prostrado, tipo de crescimento determinado, semi-determinado ou indeterminado, resistência a deiscência das vagens, as hastes e vagens quando pubescentes se encontram na cor cinza ou marrom. (Sedyama; Teixeira; Barros, 2009; Sedyama; Teixeira; Reis, 2005).

Conforme a Secretaria de Comércio e Relações Internacionais do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), as exportações brasileiras do agronegócio em 2023 atingiu o valor recorde de U\$\$ 166,55 bilhões. Em comparação a 2022, o montante foi superior em 4,8%, representando um aumento de U\$\$ 7,68 bilhões. Em relação a pauta exportadora brasileira desse ano, o agronegócio foi responsável por 49% do total e desse total a soja correspondeu a um valor de 40,4%, demonstrando ser uma cultura de grande importância.

Nacionalmente, no contexto do agronegócio, a soja é a principal cultura de produção e exportação do país, vem apresentando elevados índices de crescimento



nos últimos anos, como apresentado no parágrafo anterior. isso pode ser explicado pela ampliação do mercado internacional de mercadorias oriundas do complexo da soja, que é fonte de proteína e óleo vegetal. Pode ser utilizada como adubo verde e forrageiro na alimentação animal, o óleo extraído do seu grão pode ser utilizado na alimentação humana, na produção de biodiesel, como desinfetante, lubrificante e outros fins. O farelo é importante na alimentação humana e animal, além de ser utilizado na fabricação de outros produtos (Silva et al., 2022).

## **2.2. *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidóptera: Noctuidae)**

A lagarta do cartucho (LFM) é um inseto lepidóptero, pertence ao gênero *Spodoptera* da família Noctuidae. Compreende cerca de 31 espécies distribuídas em seis continentes; e aproximadamente 15 dessas espécies, incluindo *S. frugiperda*, são pragas importantes de muitas plantas cultivadas (Pogue 2002).

É uma praga altamente polífaga que pode atacar mais de 350 hospedeiros comerciais e não comerciais em 76 famílias de plantas (Casmuz et al., 2010.; Montezano et al., 2018). Causa danos em uma variedade de culturas agrícolas, incluindo milho, *Zea mays* L. (Poales: Poaceae), sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Poales: Poaceae), soja, *Glycine max* (L.) Merr (Fabales: Fabaceae), algodão, *Gossypium hirsutum* L. (Malvales: Malvaceae), cevada, *Hordeum vulgare* L. (Poales: Poaceae) e trigo, *Triticum aestivum* L. (Poales: Poaceae) (Pitre e Hogg, 1983; Marengo et al., 1992; Bueno et al., 2011; Hardke et al., 2015; Yang et al., 2019), sendo preferidas as gramíneas (Montezano et al., 2018).

A morfologia do aparelho bucal evoluiu em resposta à pressão de seleção, em relação a abrasividade das folhas de grama (Kergoat et al., 2012). Uma das características da larva, segundo Godfrey (1987) é a presença de quatro pináculos no oitavo terga formando um quadrado e uma linha formando um Y invertido na cabeça. Em relação aos adultos, as principais características morfológicas, segundo Todd & Poole (1980) e revisadas por Pogue (2002): mariposas machos possuem formato triangular, manchas brancas na ponta e perto do centro das asas anteriores. Outras características morfológicas da espécie, segundo (EPPO 2021), são; a pupa é marrom com cremaster de dois espinhos; os ovos são agrupados em uma massa, composta

por múltiplas camadas, geralmente presas na parte inferior das folhas das plantas e são geralmente coberto por uma camada protetora semelhante a feltro de escamas cinza-rosadas. Outra característica importante, é sua alta capacidade de dispersão e adaptação (Kenis et al., 2022)

Em 2016, foi detectada na África Ocidental, o primeiro relato fora da sua área de distribuição nativa nas Américas (Goergen et al., 2016). Espalhou-se rapidamente sendo encontrada em 2017 na maior parte da África Subsaariana (Day et al., 2017) antes de aparecer em 2018 no Oriente Médio (EPPO, 2020) e na Índia (Deshmukh e Kalleshwaraswamy, 2018; Ganiger et al., 2018). Desde então, espalhou-se por toda a Ásia e, no início de 2020, atingiu a Austrália continental (EPPO, 2020). Devido à rápida invasão global da LFM, existe uma grande necessidade de compreender o impacto económico e as opções de gestão para esta espécie.

Em um trabalho realizado por Overton (2021), foram identificadas 71 referências que relataram perdas de rendimento em diferentes culturas devido à infestação da LFM. A maioria das pesquisas que quantificaram as perdas de rendimento e a relação entre a pressão das pragas foram focadas nas culturas; milho, sorgo e algodão, tendo algumas evidências para o milho doce, a erva bermuda e o arroz. A perda de rendimento variou entre as estratégias de gestão, com culturas geneticamente modificadas e/ou tratadas com inseticidas.

### **2.3. Controle para *Spodoptera frugiperda***

Os inseticidas químicos têm sido utilizados desde 1940 como a arma mais comum para o controle de pragas em plantas por serem os mais eficazes, oferecendo aplicação relativamente rápida, fácil e resultados satisfatórios. Apesar de algumas desvantagens, a agricultura moderna dificilmente consegue manter altos rendimentos sem insumos químicos (EPPA; 2021). A maioria dos entraves da utilização de produtos químicos resultou do uso indevido e excessivo de inseticidas e pesticidas. O constante uso indevido de compostos químicos nessas estratégias de controle tem selecionado populações de *S. frugiperda* resistentes. Carvalho et al. (2013) relataram no Brasil cepas de *S. frugiperda* resistentes 18 e 28 vezes a inseticidas organofosforados e piretróides em comparação a cepas suscetíveis. Essa situação permitiu que o inseto aumentasse sua densidade populacional. A seleção de

populações resistentes acaba por gerar a necessidade de novas moléculas com atividade potencial (Okuma; 2018, Guan; 2020, Zhao; 2020).

O controle biológico com utilização de plantas Bt, que expressam a proteína da bactéria *Bacillus thuringiensis*, é um manejo que vem sendo bastante utilizado, com bastante sucesso.

Plantas transgênicas foram desenvolvidas para controlar *S. frugiperda*, e populações resistentes às proteínas Cry1 foram caracterizadas no Brasil, Argentina, Porto Rico e sudeste dos Estados Unidos (Machado; 2020). A implementação do Bt nas culturas de milho e algodão com a proteína Cry1A demonstrou capacidade de desenvolver rapidamente forte tolerância. Foi demonstrado que pode não ser desejável usar um controle biológico projetado de forma idêntica para todas as espécies de Lepidoptera (Santos-Amaya; 2009).

A suscetibilidade de *S. frugiperda* às toxinas Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1Fa e Vip3Aa também foi estudada (Ingber; 2018; Boaventura; 2020). Nos últimos anos, foram introduzidas culturas Bt de segunda geração. Essas culturas, que combinam mais de um gene de proteína inseticida na mesma planta, proporcionam melhor controle de pragas. Algumas das novas combinações incluem a expressão dos genes Cry e Vip. As proteínas Cry e Vip têm alvos diferentes no intestino do inseto e possivelmente mecanismos de toxicidade diferentes (Lemes; 2014, Soares; 2019).

#### **2.4. Uso de *Bacillus thuringiensis* no manejo de pragas**

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é gram-positiva, aeróbica facultativa, em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela sua atividade (Glare et al., 2012; Lacey et al., 2015). Produz várias toxinas durante as fases vegetativa e de esporulação (Palma et al., 2014; Crickmore, 2017), que são tóxicas para diversas ordens de insetos e para alguns nematoides, protozoários e ácaros (Van Frankenhuyzen, 2017)

Quando  $\delta$ -endotoxinas (ou toxinas Cry) são ingeridas por um inseto suscetível, as proteínas cristalinas são solubilizadas pelo pH alcalino do intestino médio do inseto e as proteases do intestino médio são ativadas proteoliticamente. Dessa forma, as toxinas ativadas ligam-se a receptores específicos localizados na membrana celular

do inseto, ocorrendo a destruição das células epiteliais que revestem o intestino do inseto. É de consenso geral, que geralmente essas toxinas agem criando poros na membrana celular (Bravo et al. 2007). Embora a bactéria contribua para a morte do inseto, as  $\delta$ -endotoxinas podem matar algumas espécies por si mesmas se produzidas em doses suficientemente altas (Mounsef et al., 2015).

Bioinseticidas à base de Bt, vem sendo utilizados com sucesso no controle de pragas desde a segunda metade do século 20 (Rosas;Garcia, 2009; Sanchis, 2011). A bactéria *Bacillus thuringiensis* apresenta efeito letal ou subletal na fase jovem e/ou adulta de diversas ordens de insetos de importância agrícola: Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera e Orthoptera (Porcar et al., 2009; Van Frankenhuyzen, 2009; Blanco et al., 2010; 2011; Bravo et al., 2012; Bergamasco et al., 2013; Van Frankenhuyzen, 2013; Zhang et al., 2013). O bioinseticida à base de Bt com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (Bt kurstaki HD-1). Apesar de apresentar baixa toxicidade para coleópteros, dípteros e hemípteros, é eficiente no controle de lepidópteros. (Glare; O'Callaghan 2000).

Vem sendo feito um investimento considerável no campo dos biopesticidas a base de Bt, que tem ganho cada vez mais interesse. Esses investimentos tem sido através de empresas que realizam pesquisa e desenvolvimento, por subvenções governamentais e até mesmo através de fundações sem fins lucrativos. A Comissão Europeia tem financiado mais de vinte projetos que buscam aprofundar o entendimento em relação a capacidade do Bt ser utilizado como biopesticidas desde 1986. Dentre estes projetos, podemos citar um curso coordenado na França, intitulado "IPM-4-Citrus, Citrus Disease Integrated Pest Management: from Research to Market" (ID: 734921; Período: De 2017-04-01 a 2021-03 -31; Custo total: 801 000 EUR) (CORDIS). O IPM-4-CITRUS se concentra em duas cepas promissoras recentemente identificadas (Btk BLB1 e Lip). Estas cepas demonstraram ser mais eficientes que a cepa comercial (Btk HD1) contra pragas de lepidópteros, tanto em termos de atividade quanto de rendimento de produção (Jallouli; 2020). Os objetivos finais do projeto IPM-4-Citrus são: otimização dos processos de bioprodução, aumento da toxicidade intrínseca das cepas e geração de bioprodutos de alto valor agregado.

## 2.5. Limitações no uso de *Bacillus thuringiensis*

Embora as formulações a base de *B. thuringiensis* tenham se tornado o biopesticida de maior sucesso no mundo, diversas limitações ainda dificultam sua aplicação. Eles são suscetíveis a uma série de fatores ambientais, como luz solar, chuva, orvalho, pH do solo e temperatura em condições de campo (Brar et al., 2006), entre os quais os raios UV da luz solar são o fator mais importante. UV-B (280–310 nm) e UV-A (320–400 nm) causarão degradação dos ICPs e reduzirão a capacidade inseticida (Sanchis et al., 1999).

Normalmente, após 1 dia de exposição à luz solar, os produtos de *B. thuringiensis* serão rapidamente inativados, mas geralmente leva de 2 a 3 dias para que os efeitos inseticidas sejam plenamente ativados. Portanto, o custo destes produtos aumenta à medida que são necessárias pulverizações repetidas (Sansinenea e Ortiz, 2015).

Segundo Pozsgay et al., (1987), após 48h horas de exposição à radiação solar, 30% do triptofano e 20% de histidina de proteínas Cry, são quebradas, diminuindo sua eficiência inseticida.

Devido as limitações descritas acima, estudos foram desenvolvidos buscando mitigar esses problemas, utilizando técnicas dentro da nanotecnologia, para que o manejo possa ser utilizado com mais eficiência.

## 2.6. Encapsulamento de *Bacillus thuringiensis*

Um dos principais objetivos do encapsulamento é garantir a estabilidade e eficácia destes organismos após aplicação no campo. Com a utilização de diversos materiais, muitos deles com propriedades fotoprotetoras, no processo de encapsulamento, permite proteção contra danos causados pela luz solar e temperaturas adversas. A partir disso, a proteção e o aumento da eficiência desses organismos após a aplicação também garantem melhor atividade residual (Kala; 2020). O encapsulamento busca também maior permeação e melhor contato com as larvas após a aplicação. A depender do tamanho e do material dessas partículas, elas terão maior interação com o organismo alvo, resultando em um maior efeito biológico (Rodrigues; 2020).

Outros objetivos do encapsulamento são proteger e prolongar a vida útil desses organismos durante o armazenamento. O encapsulamento em materiais semipermeáveis garante que a manutenção da integridade biológica dos organismos, seja mantida, garantindo viabilidade prolongada para o organismo (Martin; 2015).

Outra questão a ser destacada é que o encapsulamento também pode contribuir para melhorar a aplicação de agentes de controle microbiano com outras estratégias de controle (como inseticidas químicos). O uso de Bt e outros microrganismos agentes de controle no manejo integrado de pragas para qualquer cultura requer uma compreensão dos potenciais efeitos adversos dos agroquímicos. É importante ressaltar que esses compostos podem ser aplicados antes, depois ou junto com organismos entomopatogênicos. Essas moléculas químicas podem ter diferentes mecanismos de ação contra bactérias e fungos, que podem matar ou inibir seu crescimento e, conseqüentemente, afetar a eficácia do controle. Além disso, essas moléculas podem alterar a estrutura dos microrganismos e também interfere em suas funções celulares (Nos; 2020).

## REFERÊNCIAS

Ahirwar NK, Singh R, Chaurasia S, Chandra R, Ramana S (2020) Effective role of beneficial microbes in achieving the sustainable agriculture and eco-friendly environment development goals: a review. **Frontiers Microbiology** 5:111-123.

Brar, SK, Verma, M., Tyagi, RD e Valéro, JR (2006). Avanços recentes no processamento downstream e formulações de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis*. **Bioquímica de processos**, 41 (2), 323-342.

Barbosa RH, Kassab SO, Pereira FF, Rossoni C (2015) Controle químico e biológico de *Mahanarva fimbriolata* Stål, 1854 (Hemiptera: Cercopidae) para regiões produtoras de cana-de-açúcar de Mato Grosso do Sul. **Ambiência** 11(1):247-251.

Barcellos GA, Hanich MR, Pretto VE, Weschenfelder MA, Horikoshi RJ, Dourado PM, Ovejero RFL, Berger GU, Martinelli S, Head GP, Bernardi O (2023) Characterizing the lethal and sub-lethal effects of genetically modified soybean expressing Cry1A, Cry2Ab2, and Cry1Ac insecticidal proteins *Spodoptera species* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 79(2):548-559.

Behle RW, Tamez-Guerra P, McGuire MR (2003) Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. **Journal of Economic Entomology** 96: 1066–1075.

Bergamasco VB, Mendes DRP, Fernandes OA, Desidério JA, Lemos MVF (2013) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology** 112:152- 158.

Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68(7):1083-1091.

Bitton G, Henis Y, Lahav N (1972) Efeito de vários minerais de argila e ácido húmico na sobrevivência de *Klebsiella aerogenes* expostos à irradiação ultravioleta. **Applied Microbiology** 23:870-874.

Blanco CA, Gould F, Groot AT, Abel CA, Hernandez G, Perera OP, Teran-Vargas AP (2010) Offspring from sequential matings between *Bacillus thuringiensis* -resistant and *Bacillus thuringiensis*-susceptible *Heliothis virescens* Moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 103:861-868.

Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest management Science** 75(10):2682-2689.

Borges R (2011) **Evaluation and selection of new toxic bait formulations for *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) tested in laboratory and apple orchards.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages.

Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423–435. Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology** 33:161–168

Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Almazan CR, Pardo L, Soberón M (2012) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology** 6:17–26.

Campos EV, Proença PL, Oliveira JL, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF (2019) Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators** 105:483-495.

Cantwell GE, Franklin BA (1966) Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 8(2):256-258.

Casmuz, A. (2010) Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 69, p. 209–231

Casanova F, Santos L (2016) Encapsulation of Cosmetic Active Ingredients for Topical Application – a Review. **Journal of Microencapsulation** 33(1):1–17

Chandrasena DI, Signorini AM, Abratti G, Storer NP, Olaciregui ML, Alves AP, Pilcher CD (2018) Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F  $\delta$ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest of management science** 74(3):746-754.

Chattopadhyay P, Banerjee G, Mukherjee S (2017) Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **Biotechnology** 37:1-11.

CORDIS. - IPM-4-Citrus, Citrus disease integrated pest management: **from research to market**. <https://cordis.europa.eu/project/id/734921>. (Acesso em 26.12.2023).

Cohen E, Rozen H, Joseph T, Braun S, Margulies L (1991) Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet irradiation. **Journal of Invertebrate Pathology** 57(3):343-351.

da Silva SCM, da Silva IF, Ávila CJ, de Oliveira HN (2020) Anticontaminants to replace formaldehyde in an artificial diet used for rearing the sugarcane borer can affect the parasitoids performance?. **International Journal of Tropical Insect Science** 40(4): 1079-1084.



Dalvi LP, Andrade GS, Pratissoli D, Polanczyk RA, de Melo RL (2011) Compatibility of biological agents to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Agrarian** 4(12):79-83.

Day R, Abrahams P, Bateman M, Beale T, Clotney V, Cock M, Colmwnarez Y, Corniani N, Early R, Godwin J, Gomes J, Moreno PG, Murphy ST, Oppong-Mensah B, Phiri N, Pratt C, Silvestri S, Witt A (2017) Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Management** 28(5):196-201.

De Oliveira JL, Fraceto LF, Bravo A, Polanczyk RA (2021) Encapsulation strategies for *Bacillus thuringiensis*: From now to the future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 69(16): 4564-4577.

Edosa TT, Dinka TD (2021) Current and future potential distribution, risk and management of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Innovative Agriculture** 8: 14-23.

EUROPEAN COMMISSION. **Maximum Residue Levels | Food Safety**. Disponível em: <[https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels_en)> Acesso em: 24.10.2022

EPPO (2020). *Spodoptera frugiperda* –EPPO global database. Disponível em :< <https://gd.eppo.int/taxon/LAPHFR/distribution>> Acesso em: 05.10.2022

EPPO, (2021). *Spodoptera frugiperda*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Disponível em:< <https://gd.eppo.int>> Acesso em: 05.10.2022

Farias JR, Horikoshi RJ, Santos AC, Omoto C (2014) Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology** 107(6):2182-2189.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (FAO), **Global Action for Fall Armyworm Control**. Disponível em: <[fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/](https://fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/)> Acesso em: 24.10.2022

Garlet CG, Gubiani PDS, Palharini RB, Moreira RP, Godoy DN, Farias JR, Bernardi O (2021) Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science** 77(12):5367-5374.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age?. **Trends in biotechnology** 30(5): 250-258.

Glare, T. R.; O'Callaghan, M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: **John Wiley**, 2000. 350

Godfrey, G. L. (1987). Noctuidae (Noctuoidea). In F. W. Stehr (Ed.), *Immature Insects*. Dubuque, Iowa: Kendal/Hunt Publishing Company. In: Kenis, M., Benelli, G., Biondi, A., Calatayud, PA, Day, R., Desneux, N., ... & Wu, K. (2022). Invasividade, biologia, ecologia e manejo da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. **Entomologia Generalis**.

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M (2016) First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. **PLoS ONE** 11:e0165632.

Harlan, J.R (1975) *Crops and man*. Madison, Wisconsin: ASA, CSS of Am., 295p

Hawkins NJ, Bass C, Dixon A, Neve P (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews** 94(1):135-155.

Horikoshi RJ, Bernardi O, Fernando SDA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) resistant to Bt maize. **Journal of invertebrate pathology** 161:1-6.

Hymowitz, T (1970) On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v.24, n.4, p 408 -421.

Ignoffo CM, Hostetter DL, Sikorowski PP, Sutter G, Brooks WM (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology** 6(3):411-415.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Dilema no uso de defensivos agrícolas: diferenças nas práticas e políticas ligadas aos limites máximos de resíduos. N.37, 2021. Disponível em:

[http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10921/1/NT\\_37\\_Dinte\\_Dilemas\\_Uso\\_De\\_Infensivos\\_Agricolas.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10921/1/NT_37_Dinte_Dilemas_Uso_De_Infensivos_Agricolas.pdf)> Acesso em: 24.10.2022

Iqbal N, Hazra D, Purkait A, Bharati S, Kumar N, Kumar J (2020) Bioengineering of neem colloidal nano-emulsion formulation with adjuvant for better surface adhesion and long term activity in insect control. **PREPRINT (Version 1) available at Research Square**, 10.

Jacobs A, Van Vuuren A, Rong IH (2018) Characterisation of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) from South Africa. **African Entomology** 26(1):45-49.

Jallouli, W., Driss, F., Fillaudeau, L., & Rouis, S. (2020). Revisão sobre produção de biopesticidas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* desde 1990: Foco em parâmetros de bioprocessos. **Bioquímica de Processo** , 98 , 224-232.

Judd, W.S.; Camobell, C.S.; Kellog, E.A.; Donoghue, M.J. (2009) **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. Ed. Porto Alegre:Artmed. 632p.

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL (2014) *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of invertebrate pathology** 122:52-54.

Jin X, Custis D (2011) Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. **Biological Control**, 56(2):202-208.

Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré J (2021) Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 66:121-140.

Kaiser D, Bacher S, Mène-Saffrané L, Grabenweger G (2019) Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest management science** 75(2):556-563.

Kergoat, G. J., Prowell, D. P., Le Ru, B. P., Mitchell, A., Dumas, P., Clamens, A.L., Silvain, J.F. (2012). Disentangling dispersal, vicariance and adaptive radiation patterns: A case study using armyworms in the pest genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 65(3), 855–870.

Kala S, Sogan N, Agarwal A, Naik SN, Patanjali PK, Kumar J (2020) Biopesticides: Formulations and delivery techniques. In.: Egbuna C, Sawicka B (Eds.) **Natural remedies for pest, disease and weed control**. Academic Press, p. 209–220.

Kijlstra J, Patel S, Ide A, Hartmann-Wittulsky S (2021) U.S. Patent Application No. 17/264,199.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1–41.

Lade BD, Gogle DP, Lade DB, Moon GM, Nandeshwar SB, Kumbhare SD (2019) Nanobiopesticide formulations: Application strategies today and future perspectives. In: Koul O (Ed.) **Nano-biopesticides today and future perspectives**. Academic Press. p. 179-206.

Leland JE (2001) **Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African desert locust (*Schistocerca gregaria*)**. 24f. Dissertação. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Leland JE , Behle RW (2004) Formulation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, with resistance to UV degradation for control of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. In: Dugger P, Richter DA (Eds.) *Proceedings, Beltwide Cotton Conference*. National Cotton Council, Memphis TN. p 1800 – 1808.

Leong KLH, Cano RJ, Kubinski AM (1980) Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. **Environmental Entomology** 9(5):593-599.

Lewis, G.; Schire, B.; Mackinder, B; Loock, M. (2005) Legumes of the world. Kew. **The royal botanic gardens**. 577p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportações do agronegócio fecham 2023 com U\$\$ 166,55 bilhões em vendas** (2024). Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-fecham-2023-com-us-166-55-bilhoes-em-vendas>> Acesso em: 16.01.2024

Martín, MJ, Lara-Villoslada, F., Ruiz, MA, & Morales, ME (2015). Microencapsulação de bactérias: Uma revisão de diferentes tecnologias e seu impacto nos efeitos probióticos. **Ciência Alimentar Inovadora e Tecnologias Emergentes**. 27; 15-25.

McCoy T, Frank D (2020) Organic vs. conventional (synthetic) pesticides: advantages and disadvantages. Virginia Cooperative Extension, 2p.

Mishra J, Tewari S, Singh S, Arora NK (2014) Biopesticides: where we stand?. **Plant microbes symbiosis: applied facets** 37-75.

Mohan M, Gujar GT (2001) Toxicidade de cepas e formulações comerciais de *Bacillus thuringiensis* à traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.). **Proteção de Culturas** 20(4):311-316.

Monnerat R, Martins E, Macedo C, Queiroz P, Praca L, Soares CM, Moreira H, Grisi I, Silva J, Soberon M, Bravo A (2015) Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS one** 10(4):e0119544.

Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology** 26(2): 286-300.

Moreira SCS, Silva IF, Ávila CJ, Oliveira HN (2020) Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Communications** 2:ec02015.

Nascimento J, Goncalves KC, Dias NP, de Oliveira JL, Bravo A, Polanczyk RA (2022) Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control** 165:104792

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018) Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science** 74(6):1441-1448.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science** 72(9):1727-1736.

O'Sullivan JJ, Norwood EA, O'Mahony JA, Kelly AL (2019) Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. **Journal of food engineering** 243:57-69.

Otim MH, Tay WT, Walsh TK, Kanyesigye D, Adumo S, Abongosi J, Ochen S, Sserumaga J, Alibu S, Abalo G, Asea G, Agona A (2018) Detection of sister-species in invasive populations of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from Uganda. **PloS one** 13(4):e0194571.

Overton, K., Maino, JL, Day, R., Umina, PA, Bett, B., Carnovale, D., ... & Reynolds, OL (2021). Impactos globais nas colheitas, perdas de rendimento e limites de ação para a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*): uma revisão. **Proteção de Culturas**, 145, 105641.

Sansinenea, E. e Ortiz, A. (2015). Melanina: fotoproteção para biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis*. **Cartas de biotecnologia**. 37, 483-490.

Rodrigues, FJ, Cedran, MF, Bicas, JL, & Sato, HH (2020). Células probióticas encapsuladas: técnicas relevantes, fontes naturais como materiais encapsulantes e aplicações em alimentos – Uma revisão narrativa. **Pesquisa Alimentar Internacional**, 137, 109682.

Rosas-Garcia NM (2009) Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. **Recent Patents on Biotechnology** 3:28- 36

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins** 6(12):3296-3325.

Paredes-Sánchez FA, Rivera G, Bocanegra-García V, Martínez-Padrón HY, Berrones-Morales M, Niño-García N, Herrera-Mayorga V (2021) Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. **Molecules** 26(18):5587.

Paulo F, Santos L (2017) Design of Experiments for Microencapsulation Applications: A Review. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications** 77:1327–1340.

Peralta, C., Palma, L. (2017). Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins**, 9(1): 39.

Perini CR, Tabuloc CA, Chiu JC, Zalom FG, Stacke RF, Bernardi O, Nelson DR, Guedes JC (2021) Transcriptome Analysis of Pyrethroid-Resistant *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) Reveals Overexpression of Metabolic Detoxification Genes.. **Journal of Economic Entomology** 1:274-283.

Pogue MG (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera:Noctuidae). **American Entomological Society** 1–202

Polanczyk RA, Alves SB, Padulla LF (2005) Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Biopesticides International** 1(1): 2.

Posadas JB, Maricel AL, Mini Jorge I, Lecuona ER (2012) Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal** 20(7):1024-1030.

Pozsgay M, Fast P, Kaplan H, Carey PR (1987). The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: A Raman spectroscopic study. **Journal Invertebrate Pathology** 50:246-253.

Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T, Carey PR (1991) The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. **Biochemical journal** 273(1):43-47.

Sanchis V (2011) De sprays microbianos a plantas transgênicas resistentes a insetos: história do bio-pesticida *Bacillus thuringiensis*. Uma revisão. *Agronomia para o desenvolvimento sustentável* 31:217-231.

Sediyama, T.; Teixeira, R.C.; Barros, H.B. (2008) Cultivares. In: Silva, F., Borém, A., Sediyama, T., & Câmara, G. (2022). **Soja: do plantio à colheita**. 2 ed. 24 - 25

Sediyama T.; Teixeira, R.C.; Reis, M.S. Melhoramento da soja. In: Silva, F., Borém, A., Sediyama, T., & Câmara, G. (2022). **Soja: do plantio à colheita**. 2 ed. 24 - 25

Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of invertebrate pathology** 88(1):1-7.

Shasha BS, McGuire MR, Behle RW (1998) Lignin-based pest control formulations. US Patent 5750467.

Silva, F., Borém, A., Sediyaama, T., & Câmara, G. (2022). **Soja: do plantio à colheita**. 2 ed. 24 – 25

Stacke RF, Godoy DN, Halberstadt SA, Bronzatto ES, Giacomelli T, Hettwer BL, Muraro DS, Guedes JVC, Bernardi O (2020) Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance, fitness costs and cross-resistance to other pyrethroids in soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection** 131.

Sun XX, Hu CX, Jia HR, Wu QL, Shen XJ, Zhao SY, Jiang YY, Wu KM (2021) Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture** 20(3):664-672.

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology** 39(1):47-79.

Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Hamm JJ, Sumner RH, Shasha SS (2000) Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculoviruses isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 93:210–218.

Todd, E. L., & Poole, R. W. (1980). Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the Western hemisphere. **Annals of the Entomological Society of America**, 73(6), 722–738 In: Kenis, M., Benelli, G., Biondi, A., Calatayud, PA, Day, R., Desneux, N., ... & Wu, K. (2022). Invasividade, biologia, ecologia e manejo da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. **Entomologia Generalis** .

Van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101:1-16.

Van Frankenhuyzen K (2013) Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 114:76-85.

Van Frankenhuyzen K (2017) Specificity and cross-order activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.)



*Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol. New York: *Springer International Publisher*, p. 127-172

Vassilev N, Vassileva M, Martos V, Garcia del Moral LF, Kowalska J, Tylkowski B, Malusá E (2020) Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. **Frontiers in plant Science** 11: 270.

Vega CRYH, Roos YH (2006) Invited review: spray-dried dairy and dairy-like emulsions—compositional considerations. **Journal of dairy science** 89(2):383-401.

Wakefield ME (2018) Microbial biopesticides. **Recent advances in stored product protection** 143-168.

Wu QL, He LM, Shen XJ, Jiang YY, Liu J, Hu G, Wu KM (2019) Estimation of the potential infestation area of newly-invaded fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in the Yangtze River Valley of China. **Insects** 10(9):298.

Zhang JT, Yan JP, Zheng DS, Sun YJ, Yuan ZM (2008) Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of applied microbiology** 105(1):151-157.

Zhang Y, Ma Y, Wan PJ, Mu LL, Li GQ (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. **Journal of Economic Entomology** 106:614- 62

## **CAPÍTULO 2 – Mortalidade de lagartas *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), submetidas a formulações biológicas microencapsuladas, em laboratório**

**RESUMO:** A *Spodoptera frugiperda*, é uma praga de grande importância mundial. Tem rápida capacidade de disseminação e também, rápida capacidade de evolução de resistência. Atualmente, seu controle é realizado através de inseticidas químicos, e plantas geneticamente modificadas, ambas as táticas de controle apresentam limitações. O controle biológico, através de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, tem se mostrado uma ferramenta eficaz, porém, apresentam elevada sensibilidade a fatores climáticos, que podem reduzir sua eficiência. Uma das formas de contornar essa limitação, é através do uso de técnicas de encapsulamento. Portanto, o trabalho teve como objetivo obter formulações a base de *Bacillus thuringiensis* microencapsuladas. As formulações foram obtidas através da técnica de spray-dryer. Foram testadas diferentes formulações a base de *Bacillus thuringiensis aizawai* (Xentari®) e *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Dipel®), encapsuladas, e não encapsuladas, em lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Para as formulações encapsuladas, foi utilizado um polissacarídeo como material de parede e a lignina e ácido húmico utilizados como materiais fotoprotetores. Para avaliação de eficiência, foram realizados testes de patogenicidade em condições de laboratório. Os resultados demonstraram que todas as formulações encapsuladas contendo *Bacillus thuringiensis aizawai* e *Bacillus thuringiensis kurstaki* apresentaram mortalidade da lagarta *S. frugiperda* a cima de 80%, que são consideradas formulações eficientes, o que indica que nem a metodologia, e nem o material utilizado para o encapsulamento, afetaram negativamente a eficiência do microorganismo.

**Palavras- chave:** Nanotecnologia, controle biológico, lagarta do cartucho

## 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga de destaque no cenário agrícola mundial. Possui hábito polífago (Pogue 2002). Possui alto poder de disseminação, tendo sido reportada nas Américas, posteriormente no continente Africano e mais recentemente na Ásia (Day et al., 2017; Jacobs et al., 2018; Sun et al., 2021; Wu et al., 2019). Outra característica importante é a rápida capacidade de evolução da resistência, segundo Arthropod Pesticide Resistance Database, há relatos de mais de 140 casos de resistência de *Spodoptera frugiperda* a 40 ingredientes ativos diferentes (Montezano, 2018; FAO; 2022, Edosa, 2021).

No atual contexto da agricultura brasileira, o controle da FAW é realizado com o uso de inseticidas químicos (Okuma et al. 2018; Bolzan et al. 2019; Garlet et al. 2021), plantas geneticamente modificadas, que expressam genes de proteínas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bernardi et al. 2012, Barcellos et al. 2023) Embora, essas táticas têm uma ampla adoção, recentemente, tem apresentado uma rápida seleção de populações resistentes (Stacke et al. 2020, Perini et al. 2021, Farias et al. 2014, Omoto et al. 2016). Com o uso de bioinseticida, essa seleção ocorre de forma mais lenta, devido a inúmeras características inerentes ao grupo (Nascimento et al. 2022). Além de estarem selecionando populações resistentes, o controle químico pode também afetar negativamente o meio ambiente e a saúde humana. (Tabashinik, 1994; Paredes-Sánchez, 2021; Hawkins; 2019, Ipea, 2021).

A utilização de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, se destaca como uma ferramenta eficiente para o controle de pragas, baixa toxicidade aos indivíduos que não são alvos e lenta seleção de indivíduos resistentes, o que contribui para uma agricultura sustentável (Palma et al., 2014). No entanto, apesar de ser uma importante ferramenta de controle, os Bt bioinseticidas possuem elevada sensibilidade a fatores climáticos (Palma et al., 2014, Nascimento et al. 2022). A radiação ultravioleta (UV) é um dos principais limitantes, reduzindo a persistência do bioinseticida. (Cantwell 1966, Pozsgay et al. 1987). Esse fator pode acarretar no aumento de custo de produção para os agricultores, visto que, ao reduzir a persistência de bioinseticidas a base de Bt resulta em um menor controle de pragas, implicando na necessidade de outras

aplicações (Chattopadhyay, 2017; Bock, 2021; Leong et al. 1980; Glare et al. 2012, Nascimento et al. 2022, Lacey et al. 2015). Porém, uma maneira de melhorar a persistência de Bt bioinseticidas é o uso de técnicas de encapsulamento (Vemmer and Patel, 2013, Kala et al., 2020). O encapsulamento pode aumentar a persistência do bioinseticida, através da proteção do microrganismo, fornecendo um microambiente benéfico ao mesmo, e protegendo o agente de controle biológico de condições adversas do ambiente exterior e do estresse mecânico, conseqüentemente, aumentando a atividade biológica sobre as pragas alvo (Paula et al., 2011; Paulo & Santos, 2017; Lade et al., 2019; De Oliveira, 2021).

O processo de encapsulamento pode ser realizado através de várias metodologias, e matrizes (De Oliveira, 2021). Apesar do número variado de técnicas e material de parede, para determina-los, é necessário levar em consideração parâmetros como o tipo e característica do microrganismo, compatibilidade do material de parede com o ingrediente ativo, qual será a aplicação do organismo encapsulado e o objetivo do encapsulamento (Kala et al., 2020). As matrizes de origem natural, se destacam por apresentarem baixo custo, biocompatibilidade e baixo impacto ambiental. Dentre as técnicas disponíveis, a de spray-drying apresenta vantagens como baixo custo, rapidez em seu processo, e não necessita de lavagens para a eliminação de resíduos ou solventes (O'Sullivan et al., 2019; Campos et al., 2019; Vassilev, 2020).

Dentre as matrizes de origem natural que apresentam proteção UV incluem a lignina e os ácidos húmicos. A utilização da lignina tem sido reportada como foto protetor em vários grupos de microrganismo, como vírus entomopatogênicos (Shasha et al. 1998; Tamez-Guerra et al. 2000; Behle et al. 2003), foram também realizados testes de formulações com lignina para fungos entomopatogênicos (Leland 2001 ; Leland & Behle2004 ) e mais recentemente usado para a formulações de químicos (Kijlstra et al. 2021).o uso de ácido húmico também é reportado para proteção de vários microrganismo (Posadas et al. 2012, Kaiser et al.2019).

O objetivo deste estudo foi testar se a metodologia e o material utilizado para o encapsulamento, afetaria na patogenicidade do microrganismo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal, São Paulo.

### **2.1 População de *Spodoptera frugiperda***

A população de *S. frugiperda* foi obtida a partir da criação já estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP/FCAV, São Paulo, Brasil. Os insetos foram criados em condições controladas ( $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo longo e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ .) e sem exposição a toxinas Cry. As lagartas foram alimentadas com uma dieta artificial de Greene (1976) e os adultos alimentados com solução de mel 10%.

### **2.2 Preparo das formulações de micropartículas**

As formulações microencapsuladas foram preparadas através da técnica de spray-drying utilizando um mini spray drying LM MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda., Ribeirão Preto). As formulações foram preparadas baseadas nos ingredientes ativos descritos na Tabela 1. Como material de parede, matrizes, ou protetores térmicos, foram utilizados: goma arábica (10%), maltodextrina (10%), Lignina (1% e 2%) e Ácido húmico (1% e 2%). As condições de spray-drying foram ajustadas sendo: temperatura de entrada 90 °C, temperatura de saída 50°C, fluxo do ar de secagem de 1,8 m<sup>3</sup>/min, vazão de alimentação de 0,3 L/h, vazão de ar de atomização de 40 L/h e bico pulverizador de 1mm.

**Tabela 1** - Moléculas avaliadas quanto ao seu potencial de proteção de UV sobre *Bt aizawai*/ *Bt kurstaki*.

Tratamento	Ingrediente ativo	Material de parede	Protetor térmico	Abrev.
T1	<i>Bt aizawai</i>	-		BTA
T2	<i>Bt aizawai</i>	+		MP BTA
T3	<i>Bt aizawai</i> / <i>Bt kurstaki</i>	-		BTA/BTK
T4	<i>Bt aizawai</i> / <i>Bt kurstaki</i>	+		MP BTA/BTK
T5	<i>Bt aizawai</i> / <i>Bt kurstaki</i>	+	1% Lignina	BTA/BTK 1% LIG
T6	<i>Bt aizawai</i> / <i>Bt kurstaki</i>	+	2% Lignina	BTA/BTK 2% LIG
T7	<i>Bt aizawai</i> / <i>Bt kurstaki</i>	+	1% Ácido Húmico	BTA/BTK 1% AH
T8	<i>Bt aizawai</i> / <i>Bt kurstaki</i>	+	2% Ácido Húmico	BTA/BTK 2% AH
T9	<i>Bt aizawai</i>	+	1% Lignina	BTA 1% LIG
T10	<i>Bt aizawai</i>	+	2% Lignina	BTA 2% LIG
T11	<i>Bt aizawai</i>	+	1% Ácido Húmico	BTA 1% AH
T12	<i>Bt aizawai</i>	+	2% Ácido Húmico	BTA 2% AH
T13	Controle	-		

### 2.3 Bioensaios de patogenicidade

Para os bioensaios de patogenicidade foram utilizadas as formulações indicadas na Tabela 1. Além disso, as matrizes utilizadas para o encapsulamento dos inseticidas, também foram testadas. Essas formulações foram fornecidas pelo Laboratório de Nanotecnologia Ambiental, da Universidade Estadual de São Paulo, Sorocaba, Estado de São Paulo. Em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de fase (aumento 400x), as concentrações dos bioinseticidas foram identificadas, e ajustadas para  $3 \times 10^8$  esporos/mL. Esta concentração é considerada discriminatória em testes de patogenicidade de *Bt* para insetos praga (Polanczyk; Alves; Padulla, 2005).

Para os bioensaios, uma alíquota de 70  $\mu$ L desta concentração foi aplicada na superfície do disco de dieta artificial de Greene (1976) previamente distribuída em um recipiente (2 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro) (Figura 1). Após a evaporação do excesso de umidade da dieta, 70 lagartas neonatas foram distribuídas em 7 repetições (10 lagartas cada repetição) (Figura 2). No lote correspondente à testemunha foi aplicada uma mistura de água destilada com Tween<sup>®</sup> 0,1%, em volume equivalente aos lotes tratados.

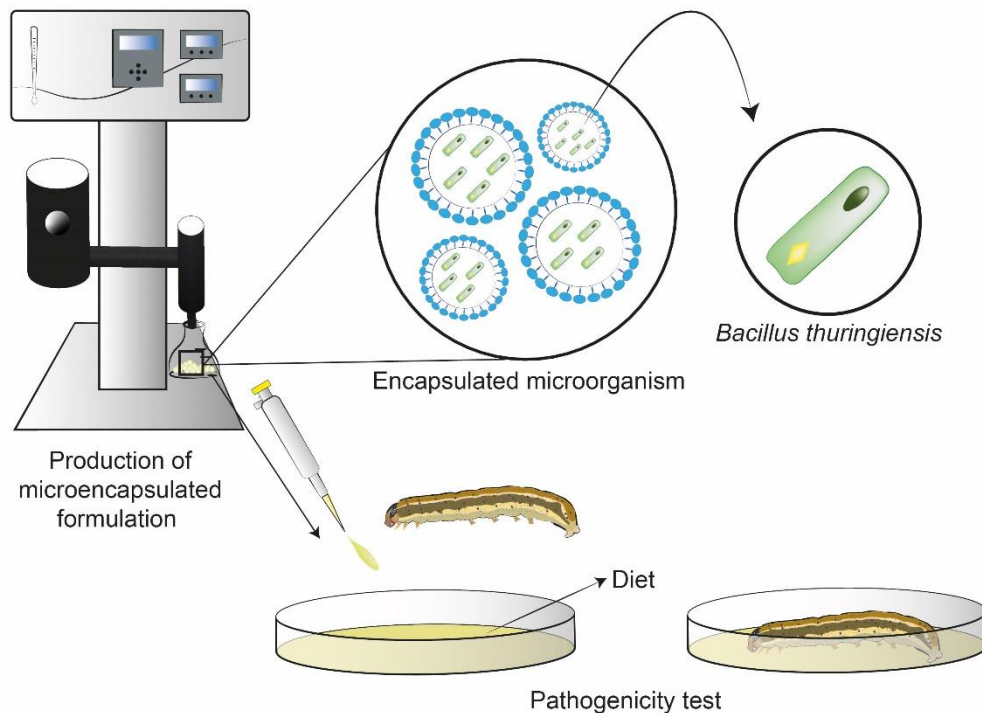
As lagartas foram mantidas em ambiente controlado, a uma temperatura de  $25\pm 0,5$  °C,  $65\pm 10\%$  de UR e 12 horas de fotoperíodo para acondicionamento do bioensaio. As avaliações desses testes ocorreram todos os dias, até o 7º dia após aplicação das formulações. Após a análise da variância, os dados foram submetidos ao Teste de Scott-nott a 5% e, ao Método de Probit com a finalidade de avaliar tempo letal. Utilizou-se o software R® e o Polo Plus.



**Figura 1** - Distribuição da dieta nos recipientes, para posterior adição dos tratamentos e dos insetos, para a condução do experimento.



**Figura 2** - Lagarta *S. frugiperda* neonata, disposta no recipiente em conjunto com a dieta e os tratamentos previamente aplicados.



**Figura 3** – Produção de formulações microencapsuladas de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, através da técnica de spray-dryer. Aplicação da formulação em dieta e ofertada a *Spodoptera frugiperda* para teste de patogenicidade.

### 3. RESULTADOS

Os bioensaios de patogenicidade avaliados, demonstraram que as matrizes utilizadas para o preparo das formulações, não apresentaram efeito de mortalidade. Todas as formulações contendo *Bacillus thuringiensis* na sua formulação apresentaram resultados de mortalidade superiores a 80% (Tabela 2).

**Tabela 2** - Avaliação de mortalidade e tempo letal de *S. frugiperda* expostas as formulações microencapsuladas

Formulações	Mortalidade (%)	Tempo Letal (horas)
Controle	8,8 e	-
MP	12 e	-
Xentari®	88,6 b	126,9 (108,0 – 158,7)
MP_Bta	84,44 b	90,3 (77,7 – 104, 1)



Dipel®/ Xentari®	91,1 b	88,8 (76,3 – 101,9)
MP_Btk/Bta	87,5 b	140,3 (115,2 – 202,1)
MP Bta 1% Lig	85,71b	112,0 (97,6 – 134,8)
MP Bta 2% Lig	100 a	62,5 (59,2 – 65,7)
MP Bta 1% AH	100 a	88,49 (78,0 – 98,8)
MP Bta 2% AH	100 a	57,8 (44,8 – 69,9)
MP Bta/Btk 1% Lig	100 a	72,9 (68,8 – 75,9)
MP Bta/Btk 2% Lig	87,5 b	111,0 (99,0 – 126,4)
MP Bta/Btk 1% AH	95,71 a	111,0 (79,3 – 169,8)
MP Bta/Btk 2% AH	97,14 a	93,7 (79,1 – 109,4)
AH 1%	1,42 e	-
AH 2%	1,42 e	-
LIG 1%	4,25 e	-
LIG 2%	5,71 e	-

Os valores de mortalidade designados pelas mesmas letras dentro de uma coluna para cada espécie não são significativamente diferentes entre si,  $p < 0,05$

Não foram observadas diferenças significativas entre as formulações comerciais (não encapsuladas) e os produtos microencapsulados para os testes de mortalidade, diante disso, pode-se dizer que em condições de laboratório o processo de encapsulamento utilizado não apresentou danos aos microrganismos, que poderiam influenciar na patogenicidade microrganismo testado. Os valores de mortalidade de todas as formulações apresentaram mortalidade superior a 80% em estudos de patogenicidade.

Os testes de tempo letal, apresentaram diferentes valores conforme as diferente cepas e proporção de protetores, Xentari apresentou um TL de 126,9 horas, a cepa encapsulada apresentou uma mortalidade 90,3 horas. Xentari/Dipel também apresentaram resultados com diferença significativa pela análise dos intervalos de confiança, quando comparados a Xentari/Dipel encapsulados (MP\_Btk/bta) os tratamentos mostraram valores de mortalidade de 88,8 e 140,3 respectivamente. Nos demais tratamentos o tempo letal sofre influência em função da proporção de ácido húmico e lignina.

#### 4. DISCUSSÃO

O teste de mortalidade conduzido em laboratório obteve mortalidade acima de 80% em todos os tratamentos. Segundo Polanczyk (2004) os tratamentos que apresentam valores de mortalidade superior a 80%, são resultados promissores para a condução de estudos de virulência. É importante para entendimento, diferenciar os testes de patogenicidade e virulência uma vez que a patogenicidade é a capacidade potencial de produzir doença, enquanto a virulência é o grau de patogenicidade dentro de um grupo ou espécie (Shapiro-Ilan et al., 2005). para os testes de virulência, frequentemente são utilizados testes de CL<sub>50</sub> para quantificar a patogenicidade dos organismos (Shapiro-Ilan et al., 2005).

Nos testes de tempo letal ocorreram diferenças significativas, que podem ter sido ocasionadas por duas situações, pode ser associado ao aumento da superfície de contato promovida pelo processo de encapsulamento. O uso de técnicas de encapsulamento promove um aumento da mortalidade, através do aumento da área de superfície específica (Iqbal et al., 2020). Isso pode ser observado quando observamos (tabela 2) o tempo letal de Xentari em comparação a Xentari encapsulado (MP Bta), que promoveu uma redução no tempo letal de aproximadamente 30%, no entanto a mortalidade dos dois tratamentos não apresentou diferença significativa.

Por outro lado, os autores obtiveram resultados que mostraram que as formulações microencapsuladas promoveram uma mortalidade mais lenta, quando comparadas ao tratamento Dipel/Xentari com Dipel/Xentari encapsulado (MP Btk/Bta), a formulação apresentou um acréscimo de aproximadamente 38% no tempo letal. Em alguns casos formulações encapsuladas apresentam liberação controlada, que pode promover um atraso na mortalidade quando comparado a formulações não encapsuladas (Mishra, et al 2014).

Os fotoprotetores (lignina e ácido húmico), não promoveram diferenças significativas na mortalidade nos testes de laboratório, no entanto, na variável tempo letal podemos observar que teve influência, quando utilizamos a técnica de encapsulamento sobre Bta, observamos uma redução no tempo de mortalidade com citado anteriormente, no entanto quando adicionamos a lignina, promoveu um aumento no tempo letal, em comparação a formulações somente

com a matriz, com valores de tempo letal de 112,0 e 90,3 horas, respectivamente, no entanto quando a formulação continha 2% de lignina, o tempo letal foi de 62,5 horas.

O maior tempo letal de algumas formulações, pode estar associado à interação da matriz e/ou fotoprotetores com o sistema imune do inseto, e essa resposta pode retardar a ação da formulação. Em relação as formulações encapsuladas que promoveram um menor tempo letal, isso pode estar relacionado a matriz ser a combinação de polissacarídeos que podem ter uma propriedade fagoestimulante que pode aumentar o consumo de dieta e promover uma maior ingestão de ingrediente ativo, que pode acelerar o processo de mortalidade, e influenciar no tempo letal. (Borges, 2011).

Segundo Mohan e Gujar, (2001) a especificidade dos bioinseticidas a base de Bt, variam de acordo com o tipo e a quantidade de proteínas pesticidas Cry na formulação, além disso, foi demonstrado que diferentes populações de *S. frugiperda* provenientes de diferentes regiões podem variar em sua suscetibilidade as proteínas Cry (Monnerat et al., 2006). Nesse experimento, foi utilizado a mescla dos agentes de controle biológico com objetivo inicial de aumentar o espectro de ação da formulação, contra mais de uma praga-alvo. No entanto, os produtos Xentari® e Dipel®, diferem ligeiramente nas toxinas que produzem, visto que, as toxinas Cry2 exibem baixa atividade contra *S. frugiperda*, mesmo que a proporção relativa de Cry1Ca/Cry1Da em Xentari® e Cry2Aa/Cry2Ab em Dipel® sejam semelhantes e representam cerca de 24-26% da toxina total em cada biopesticida, e as toxinas de Xentari® apresentem boa atividade contra essas larvas (Jakka et al., 2014). Portanto, a menor performance da formulação mista, pode estar relacionada a menor suscetibilidade da população trabalhada com o produto Dipel®, tendo em vista que este representa a maior concentração de organismo da formulação, o que pode influenciar o controle.

Além da maior proporção de Dipel® nas mesclas, em relação ao Xentari®, durante o processo de produção das microcápsulas, podem ocorrer danos em algumas bactérias, e não há como saber exatamente, qual a proporção de Dipel® foi encapsulada, e qual a de Xentari®, o que também pode ser uma explicação para a menor eficiência das mesclas no controle da lagarta.

## 5. CONCLUSÕES

Os testes conduzidos em laboratório mostraram que a técnica de encapsulamento não prejudicou os ingredientes ativos, devido as altas mortalidades registradas (> de 80%). Os materiais utilizados como material de parede, também foram compatíveis com o microrganismo, sendo eficientes para o encapsulamento.

## REFERÊNCIAS

Barcellos GA, Hanich MR, Pretto VE, Weschenfelder MA, Horikoshi RJ, Dourado PM, Ovejero RFL, Berger GU, Martinelli S, Head GP, Bernardi O (2023) Characterizing the lethal and sub-lethal effects of genetically modified soybean expressing Cry1A, Cry2Ab2, and Cry1Ac insecticidal proteins against *Spodoptera species* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 79(2):548-559.

Behle RW, Tamez-Guerra P, McGuire MR (2003) Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. **Journal of Economic Entomology** 96: 1066–1075.

Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68(7):1083-1091.

Bitton G, Henis Y, Lahav N (1972) Efeito de vários minerais de argila e ácido húmico na sobrevivência de *Klebsiella aerogenes* expostos à irradiação ultravioleta. **Applied Microbiology** 23:870-874.

Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest management Science** 75(10):2682-2689.

Borges R (2011) **Evaluation and selection of new toxic bait formulations for *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) tested in**

**laboratory and apple orchards.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages.

Campos EV, Proença PL, Oliveira JL, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF (2019) Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators** 105:483-495.

Cantwell GE, Franklin BA (1966) Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 8(2):256-258.

Chandrasena DI, Signorini AM, Abratti G, Storer NP, Olaciregui ML, Alves AP, Pilcher CD (2018) Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F  $\delta$ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest of management science** 74(3):746-754.

Chattopadhyay P, Banerjee G, Mukherjee S (2017) Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **Biotechnology** 37:1-11.

Cohen E, Rozen H, Joseph T, Braun S, Margulies L (1991) Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet irradiation. **Journal of Invertebrate Pathology** 57(3):343-351.

da Silva SCM, da Silva IF, Ávila CJ, de Oliveira HN (2020) Anticontaminants to replace formaldehyde in an artificial diet used for rearing the sugarcane borer can affect the parasitoids performance?. **International Journal of Tropical Insect Science** 40(4): 1079-1084.

Day R, Abrahams P, Bateman M, Beale T, Clotey V, Cock M, Colmwnarez Y, Corniani N, Early R, Godwin J, Gomes J, Moreno PG, Murphy ST, Oppong-Mensah B, Phiri N, Pratt C, Silvestri S, Witt A (2017) Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Management** 28(5):196-201.

De Oliveira JL, Fraceto LF, Bravo A, Polanczyk RA (2021) Encapsulation strategies for *Bacillus thuringiensis*: From now to the future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 69(16): 4564-4577.

Edosa TT, Dinka TD (2021) Current and future potential distribution, risk and management of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Innovative Agriculture** 8: 14-23.

EUROPEAN COMMISSION. **Maximum Residue Levels | Food Safety**. Disponível em: <[https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels_en)> Acesso em: 24.10.2022

Farias JR, Horikoshi RJ, Santos AC, Omoto C (2014) Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology** 107(6):2182-2189.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (FAO), **Global Action for Fall Armyworm Control**. Disponível em: <[fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/](http://fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/)> Acesso em: 24.10.2022

Garlet CG, Gubiani PDS, Palharini RB, Moreira RP, Godoy DN, Farias JR, Bernardi O (2021) Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science** 77(12):5367-5374.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age?. **Trends in biotechnology** 30(5): 250-258.

Hawkins NJ, Bass C, Dixon A, Neve P (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews** 94(1):135-155.

Horikoshi RJ, Bernardi O, Fernando SDA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) resistant to Bt maize. **Journal of invertebrate pathology** 161:1-6.

Ignoffo CM, Hostetter DL, Sikorowski PP, Sutter G, Brooks WM (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology** 6(3):411-415.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Dilema no uso de defensivos agrícolas: diferenças nas práticas e políticas ligadas aos limites máximos de resíduos. N.37, 2021. Disponível em: [http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10921/1/NT\\_37\\_Dinte\\_Dilemas\\_Uso\\_Defensivos\\_Agricolas.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10921/1/NT_37_Dinte_Dilemas_Uso_Defensivos_Agricolas.pdf)> Acesso em: 24.10.2022

Iqbal N, Hazra D, Purkait A, Bharati S, Kumar N, Kumar J (2020) Bioengineering of neem colloidal nano-emulsion formulation with adjuvant for better surface adhesion and long term activity in insect control. **PREPRINT (Version 1) available at Research Square**, 10.

Jacobs A, Van Vuuren A, Rong IH (2018) Characterisation of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) from South Africa. **African Entomology** 26(1):45-49.

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL (2014) *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of invertebrate pathology** 122:52-54.

Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré J (2021) Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 66:121-140.

Kaiser D, Bacher S, Mène-Saffrané L, Grabenweger G (2019) Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest management science** 75(2):556-563.

Kala S, Sogan N, Agarwal A, Naik SN, Patanjali PK, Kumar J (2020) Biopesticides: Formulations and delivery techniques. In.: Egbuna C, Sawicka B (Eds.) **Natural remedies for pest, disease and weed control**. Academic Press, p. 209–220.

Kijlstra J, Patel S, Ide A, Hartmann-Wittulsky S (2021) U.S. Patent Application No. 17/264,199.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1–41.

Lade BD, Gogle DP, Lade DB, Moon GM, Nandeshwar SB, Kumbhare SD (2019) Nanobiopesticide formulations: Application strategies today and future perspectives. In: Koul O (Ed.) **Nano-biopesticides today and future perspectives**. Academic Press. p. 179-206.

Leland JE (2001) **Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African desert locust (*Schistocerca gregaria*)**. 24f. Dissertação. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Leland JE , Behle RW (2004) Formulation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, with resistance to UV degradation for control of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. In: Dugger P, Richter DA (Eds.) *Proceedings, Beltwide Cotton Conference*. National Cotton Council, Memphis TN. p 1800 – 1808 .

Leong KLH, Cano RJ, Kubinski AM (1980) Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. **Environmental Entomology** 9(5):593-599.

Mishra J, Tewari S, Singh S, Arora NK (2014) Biopesticides: where we stand?. **Plant microbes symbiosis: applied facets** 37-75.

Mohan M, Gujar GT (2001) Toxicidade de cepas e formulações comerciais de *Bacillus thuringiensis* à traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.). **Proteção de Culturas** 20(4):311-316.

Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology** 26(2): 286-300.

Moreira SCS, Silva IF, Ávila CJ, Oliveira HN (2020) Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Communications** 2:ec02015.

Nascimento J, Goncalves KC, Dias NP, de Oliveira JL, Bravo A, Polanczyk RA (2022) Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control** 165:104792

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018) Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science** 74(6):1441-1448.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to



Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science** 72(9):1727-1736.

O'Sullivan JJ, Norwood EA, O'Mahony JA, Kelly AL (2019) Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. **Journal of food engineering** 243:57-69.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins** 6(12):3296-3325.

Paredes-Sánchez FA, Rivera G, Bocanegra-García V, Martínez-Padrón HY, Berrones-Morales M, Niño-García N, Herrera-Mayorga V (2021) Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. **Molecules** 26(18):5587.

Paulo F, Santos L (2017) Design of Experiments for Microencapsulation Applications: A Review. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications** 77:1327–1340.

Peralta, C., Palma, L. (2017). Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins**, 9(1): 39.

Perini CR, Tabuloc CA, Chiu JC, Zalom FG, Stacke RF, Bernardi O, Nelson DR, Guedes JC (2021) Transcriptome Analysis of Pyrethroid-Resistant *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) Reveals Overexpression of Metabolic Detoxification Genes.. **Journal of Economic Entomology** 1:274-283.

Pogue MG (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera:Noctuidae). **American Entomological Society** 1–202

Polanczyk RA, Alves SB, Padulla LF (2005) Screening of *Bacillus thuringiensis* against three Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Biopesticides International** 1(1): 2.

Posadas JB, Maricel AL, Mini Jorge I, Lecuona ER (2012) Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal** 20(7):1024-1030.

Pozsgay M, Fast P, Kaplan H, Carey PR (1987). The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: A Raman spectroscopic study. **Journal Invertebrate Pathology** 50:246-253.

Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T, Carey PR (1991) The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. **Biochemical journal** 273(1):43-47.

Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of invertebrate pathology** 88(1):1-7.

Shasha BS, McGuire MR, Behle RW (1998) Lignin-based pest control formulations . US Patent 5750467.

Stacke RF, Godoy DN, Halberstadt SA, Bronzatto ES, Giacomelli T, Hettwer BL, Muraro DS, Guedes JVC, Bernardi O (2020) Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance, fitness costs and cross-resistance to other pyrethroids in soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection** 131.

Sun XX, Hu CX, Jia HR, Wu QL, Shen XJ, Zhao SY, Jiang YY, Wu KM (2021) Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture** 20(3):664-672.

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology** 39(1):47-79.

Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Hamm JJ, Sumner RH, Shasha SS (2000) Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculoviruses isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 93:210–218.

Vassilev N, Vassileva M, Martos V, Garcia del Moral LF, Kowalska J, Tylkowski B, Malusá E (2020) Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. **Frontiers in plant Science** 11: 270.

Wakefield ME (2018) Microbial biopesticides. **Recent advances in stored product protection** 143-168.

Wu QL, He LM, Shen XJ, Jiang YY, Liu J, Hu G, Wu KM (2019) Estimation of the potential infestation area of newly-invaded fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in the Yangtze River Valley of China. **Insects** 10(9):298.

Zhang JT, Yan JP, Zheng DS, Sun YJ, Yuan ZM (2008) Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of applied microbiology** 105(1):151-157.

### **CAPÍTULO 3 – Persistência de *Bacillus thuringiensis* berliner, 1911 microencapsulado na cultura da soja e avaliação da mortalidade em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidóptera: Noctuidae)**

**RESUMO:** A *Spodoptera frugiperda*, é uma praga de grande importância mundial. Tem rápida capacidade de disseminação e também, rápida capacidade de evolução de resistência. Atualmente, seu controle é realizado através de inseticidas químicos, e plantas geneticamente modificadas, ambas as táticas de controle apresentam limitações. O controle biológico, através de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, tem se mostrado uma ferramenta eficaz, porém, apresentam elevada sensibilidade a fatores climáticos, que podem reduzir sua eficiência. Uma das formas de contornar essa limitação, é através do uso de técnicas de encapsulamento. Portanto, o trabalho teve como objetivo obter formulações a base de *Bacillus thuringiensis* microencapsuladas com aumento de persistência em função do tempo. As formulações foram obtidas através da técnica de spray-dryer. Foram testadas diferentes formulações a base de *Bacillus thuringiensis aizawai* (Xentari®) e *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Dipel®), encapsuladas, e não encapsuladas, em lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Para as formulações encapsuladas, foi utilizado um polissacarídeo como material de parede e a lignina e ácido húmico utilizados como materiais fotoprotetores. Para avaliação de eficiência, foram realizados testes de patogenicidade em condições de laboratório e persistência em condições de semi-campo. As formulações contendo a mistura de *Bacillus thuringiensis aizawai* e *Bacillus thuringiensis kurstaki* encapsulados não apresentaram resultados eficientes em condições de laboratório ou semi-campo, quando comparados as mesmas formulações não encapsuladas. Porém, as formulações contendo *Bacillus thuringiensis aizawai* encapsulado demonstrou maior performance nos ensaios persistência em condição de semi-campo quando comparado ao não encapsulado. Ademais a adição de ácido húmico como agente protetor UV também contribuiu para o aumento de persistência. Os resultados indicam que a microencapsulação, bem como adição de compostos com atividade protetora UV podem contribuir para o aumento de persistência de formulações de *Bacillus thuringiensis*.

**Palavras-chave:** Encapsulamento, Persistência, Controle biológico

## 1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga de destaque no cenário agrícola mundial. Possui hábito polífago, com registro em 353 plantas hospedeiras (Pogue 2002). Anteriormente sua presença era reportada nas américas, no entanto nos últimos anos foi observada no continente Africano (Day et al., 2017; Jacobs et al., 2018), e mais recentemente no continente asiático (Sun et al., 2021; Wu et al., 2019). Outra característica importante é a rápida capacidade de evolução da resistência, segundo Arthropod Pesticide Resistance Database, há relatos de mais de 140 casos de resistência de *Spodoptera frugiperda* a 40 ingredientes ativos diferentes (Montezano, 2018; FAO; 2022, Edosa, 2021).

Atualmente, o controle de *Spodoptera* é realizado com o uso de inseticidas químicos (Okuma et al. 2018; Bolzan et al. 2019; Garlet et al. 2021), plantas geneticamente modificadas, que expressam genes de proteínas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bernardi et al. 2012, Barcellos et al.2023) Embora, essas táticas têm uma ampla adoção, recentemente, tem apresentado uma rápida seleção de populações resistentes (Stacke et al. 2020, Perini et al. 2021, Farias et al. 2014, Omoto et al. 2016). Com o uso de bioinseticida, essa seleção ocorre de forma mais lenta, devido a inúmeras características inerentes ao grupo (Nascimento et al. 2022). Além de estarem selecionando populações resistentes, o controle químico pode também afetar negativamente o meio ambiente e a saúde humana. (Tabashinik, 1994; Paredes-Sánchez, 2021; Hawkins; 2019, Ipea, 2021).

O uso de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis*, se destaca como uma ferramenta eficiente para o controle de pragas, com baixo teor de resíduos nos alimentos, baixa toxicidade aos serviços do ecossistema e lenta seleção de indivíduos resistentes, contribuindo para uma agricultura sustentável (Palma et al., 2014). No entanto, apesar de ser uma importante ferramenta de controle, os Bt bioinseticidas possuem elevada sensibilidade a fatores climáticos (Palma et al., 2014, Nascimento et al. 2022). Dentre eles pode ser destacado a radiação ultravioleta (UV), que reduz a persistência dos Bt bioinseticidas (Cantwell 1966,

Pozsgay et al. 1987). Esse fator pode acarretar no aumento de custo de produção para os agricultores, visto que, ao reduzir a persistência de bioinseticidas a base de Bt resulta em um menor controle de pragas, implicando na necessidade de outras aplicações (Chattopadhyay, 2017; Bock, 2021; Leong et al. 1980; Glare et al. 2012, Nascimento et al. 2022, Lacey et al. 2015). Porém, uma maneira de melhorar a persistência de Bt bioinseticidas é o uso de técnicas de encapsulamento (Vemmer and Patel, 2013, Kala et al., 2020). O encapsulamento pode aumentar a persistência do bioinseticida, devido a proteção do microrganismo, fornecendo um microambiente benéfico ao mesmo, e protegendo o agente de controle biológico de condições adversas do ambiente exterior e do estresse mecânico, consequentemente, aumentando a atividade biológica sobre as pragas alvo (Paula et al., 2011; Paulo & Santos, 2017; Lade et al., 2019; De Oliveira, 2021).

O processo de encapsulamento pode ser realizado através de várias metodologias, e matrizes (De Oliveira, 2021). Apesar do número variado de técnicas e material de parede, para determiná-los, é necessário levar em consideração parâmetros como o tipo e característica do microrganismo, compatibilidade do material de parede com o ingrediente ativo, qual será a aplicação do organismo encapsulado e o objetivo do encapsulamento (Kala et al., 2020). As matrizes de origem natural, é um destaque, por apresentarem baixo custo, biocompatibilidade e baixo impacto ambiental. Dentre as técnicas disponíveis, a de spray-drying apresenta vantagens como baixo custo, rapidez em seu processo, e não necessita de lavagens para a eliminação de resíduos ou solventes (O'Sullivan et al., 2019; Campos et al., 2019; Vassilev, 2020).

Dentre as matrizes de origem natural que apresentam proteção UV incluem a lignina e os ácidos húmicos. O uso de lignina é reportado seu uso como foto protetor em vários grupos de microrganismo, início com vírus entomopatogênicos (Shasha et al. 1998; Tamez-Guerra et al. 2000; Behle et al. 2003), após foram realizados teste de formulações com lignina para fungos entomopatogênicos (Leland 2001 ; Leland & Behle2004 ) e mais recentemente usado para a formulações de químicos (Kijlstra et al. 2021).o uso de ácido húmico também é reportado para proteção de vários microrganismo (Posadas et al. 2012, Kaiser et al.2019).

O objetivo deste estudo foi testar o potencial de substâncias protetoras a radiação UV para aumentar a persistência de formulações a base de *Bacillus thuringiensis* e avaliar a eficiência de controle sobre *Spodoptera frugiperda*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação e na área de experimentação do Departamento de Ciências de Produção Agrícola e no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal, São Paulo.

### **2.1. População de *Spodoptera frugiperda***

A população de *S. frugiperda*, foi obtida a partir da criação já estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP/FCAV, São Paulo, Brasil. A colônia de insetos foi criada sem exposição as proteínas inseticidas Cry a  $25 \pm 2$  ° C, fotoperíodo longo e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ . As lagartas foram criadas com uma dieta artificial de Greene (1976), e os adultos alimentados com 10% de mel.

### **2.2. Condução das plantas de soja.**

Foram semeadas 4 sementes de soja da variedade Nidera 7901 em 520 vasos (40 vasos para cada tratamento) de 4L, contendo solo, esterco e areia, na proporção de 3/1/1. Os vasos foram organizados dentro da casa de vegetação, onde as plantas foram conduzidas por 77 dias. Foi realizado o desbaste 20 dias após o plantio, deixando apenas 1 planta por vaso. Adubação e irrigação foram feitas sempre que necessário. Posteriormente, as plantas foram retiradas da casa de vegetação, organizadas conforme os tratamentos e realizadas as aplicações das formulações. (Figura 1, 2 e 3).



**Figura 1** - Vasos semeados com sementes de soja organizados dentro da soja de vegetação no primeiro dia de cultivo.



**Figura 2** - Vasos com 4 sementes de soja semeados no primeiro dia de cultivo.



**Figura 3** - Plantas de soja conduzidas em casa de vegetação com 77 dias de cultivo, antes da aplicação.

### **2.3. Preparo da calda das formulações**

As caldas foram preparadas poucos minutos antes da aplicação, e foi determinada a concentração de cada uma delas, em câmara de Neubauer, em



microscópio com contraste de fase com 400x de aumento (Carl zeiss- Axio LabA1). A concentração da calda no momento da aplicação era de  $3 \times 10^8$  esporos/mL.

#### 2.4. Aplicação das formulações

Foi realizada apenas uma aplicação, no primeiro dia, as 8h da manhã, composto pelas 12 formulações, (encapsuladas e não encapsuladas), conforme descrito na Tabela 1. Foi utilizada água como controle, totalizando 13 tratamentos. Para a pulverização foi utilizado um pulverizador pressurizado com CO<sub>2</sub>, com vazão de 100 L.ha<sup>-1</sup> e pontas de pulverização com espectro de gota média. Para a aplicação, os vasos foram dispostos fora da casa de vegetação, compondo 40 vasos por tratamento (Figura 4 e 5).

**Tabela 1** - Formulações utilizadas no experimento

Tratamentos	
T1	MP BTA
T2	BTA
T3	BTA/BTK
T4	MP BTA/BTK
T5	BTA/BTK 1 % lig
T6	BTA/BTK 2% lig
T7	BTA/BTK 1% AH
T8	BTA/BTK 2% AH
T9	BTA 1% lig
T10	BTA 2% lig
T11	BTA 1% AH
T12	BTA 2% AH
T13	Controle

Legenda: BTA – *Bacillus thuringiensis aizawai*; BTA/BTK – *Bacillus thuringiensis aizawai*/*Bacillus thuringiensis kurstaki*; BTA/BTK 1% lig – *Bacillus thuringiensis aizawai*/*Bacillus thuringiensis kurstaki* com 1% de lignina; BTA/BTK 2% lig – *Bacillus thuringiensis aizawai*/*Bacillus thuringiensis kurstaki* com 2% de lignina; BTA/BTK 1% AH – *Bacillus thuringiensis aizawai*/*Bacillus thuringiensis kurstaki* com 1% Ácido Húmico; BTA/BTK 2% AH - *Bacillus thuringiensis aizawai*/*Bacillus thuringiensis kurstaki* com 2% de Ácido Húmico; BTA 1% lig - *Bacillus thuringiensis aizawai* com 1% de lignina; BTA 2% lig - *Bacillus thuringiensis aizawai* com 2% de lignina; BTA 1% AH - *Bacillus thuringiensis aizawai* com 1% de ácido húmico; BTA 2% AH - *Bacillus thuringiensis aizawai* com 2% de ácido húmico.



**Figura 4** - Aplicação das formulações bioinseticidas/tratamentos do experimento nas plantas de soja, fora da casa de vegetação.



**Figura 5** - Disposição dos tratamentos fora da casa de vegetação após aplicação dos bioinseticidas.

## 2.5. Coleta de material para avaliação

Após a aplicação, as plantas foram organizadas e identificadas conforme os tratamentos. Foram realizadas 10 coletas de material, de cada tratamento, sendo 10 avaliações por tratamento, em horários diferentes, conforme descrito na Tabela 2. Foram coletadas folhas do terço superior da planta. Logo após a

coleta, as folhas foram levadas ao laboratório para o teste de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (Figura 6).

**Tabela 2** – Dias e horários em que foram realizadas as avaliações

Avaliação	Dia	Horário do dia	Horas após a aplicação
Avaliação 1	1	8h	0h
Avaliação 2	1	16h	8h
Avaliação 3	2	8h	24h
Avaliação 4	2	16h	32h
Avaliação 5	3	8h	48h
Avaliação 6	3	16h	56h
Avaliação 7	4	8h	72h
Avaliação 8	4	16h	80h
Avaliação 9	5	8h	96h
Avaliação 10	5	16h	104h



**Figura 6** - Coleta de folhas de soja, após aplicação de bioinseticidas, para levar ao laboratório e posterior avaliação de mortalidade da lagarta *S. frugiperda*

## 2.6. Teste de mortalidade de *S. frugiperda* em condições de campo

As folhas coletadas dos vasos, em cada dia e horário, descritos na Tabela 2, foram levadas ao laboratório, cortadas em formato de disco, com o auxílio de um vazador, de 3 centímetros de diâmetro. Foram dispostos 4 discos foliares em um recipiente plástico de (7 cm de diâmetro), juntamente com uma mistura gelificada de ágar-água a 2,5% com papel filtro. Posteriormente, foram adicionadas 4 lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, em cada recipiente (Figura 7). Para cada tratamento/avaliação, foram utilizados 10 recipientes,

totalizando 40 lagartas por tratamento, distribuídas em 5 repetições. Utilizou-se no total 5.200 discos foliares e 5.200 lagartas neste ensaio. O bioensaio foi mantido em condições controladas (UR: 75 %  $\pm$ 12 e T: 25 °C  $\pm$ 2) (Figura 8). A avaliação da mortalidade das lagartas foi realizada todos os dias após a aplicação dos bioinseticidas, por 7 dias, mas, para a contabilização estatística, utilizou-se o valor da mortalidade acumulativo, somatório de todos os dias.



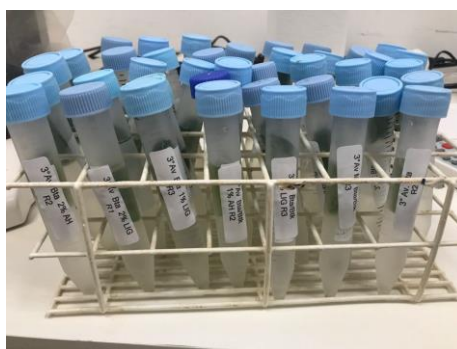
**Figura 7** - Recipiente plástico contendo mistura gélida, papel filtro e discos foliares de (amostras coletadas), onde foram adicionadas as lagartas para avaliação de mortalidade.



**Figura 8** - Recipientes plástico contendo as amostras juntamente com os insetos, separados por tratamentos, devidamente identificados.

## 2.7. Contagem de Esporos

Um disco foliar foi inserido em um tubo Falcon (15mL) com 10 mL de água destilada, e dois gramas de areia autoclavada (Collier et al., 2005), constituindo uma repetição, cada tratamento tinha 3 repetições. Posteriormente, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex (MOD. AP56 [rpm=2000]), e após foi retirado uma alíquota de 100  $\mu$ L. A contagem dos esporos foi realizada em triplicata com auxílio de câmara de Neubauer (Alves e Moraes, 1998) e microscópio de contraste de fase (Carl zeiss- Axio LabA1) em aumento de 400 x (Figura 9).



**Figura 9** - Tubo falcon de 15 mL com 10 mL de água destilada e um disco foliar de amostra, identificados conforme tratamentos, para posterior quantificação de esporos.

## 2.8. Análise estatística

Os dados de mortalidade foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ) seguido pelo teste Dunn ( $p < 0,05$ ) para comparação das médias no programa GraphPad Prism v.5. Os dados de quantificação de esporos, correlação Mortalidade x Esporos, e a relação tempo x mortalidade x tratamento foram realizados em software SAS e software R®.

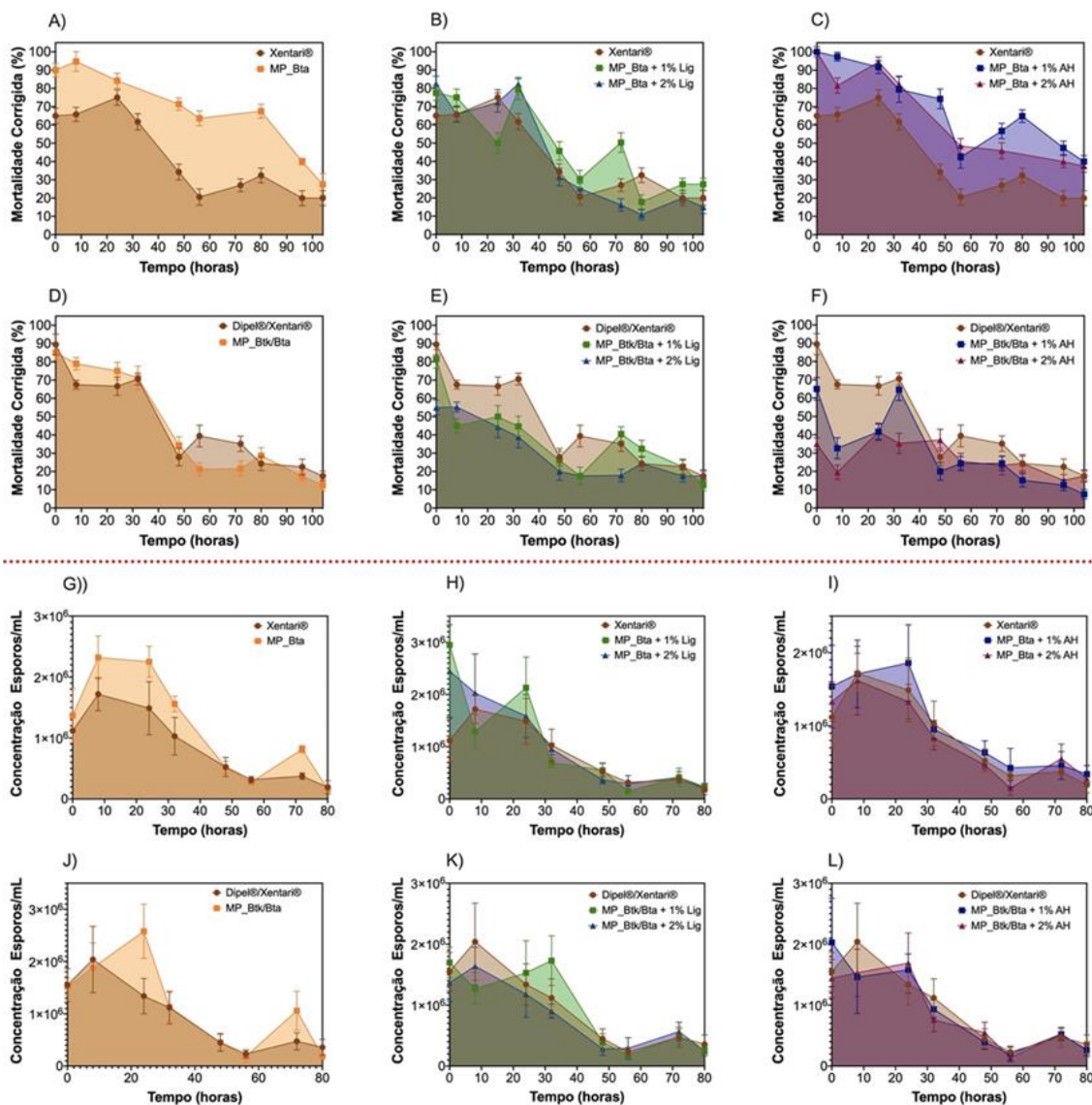
## 3. RESULTADOS

### 3.1 Resultados mortalidade *S. frugiperda* e contagem de esporos

De acordo com o teste de persistência, pode-se observar que a formulação contendo Bta isoladamente, quando encapsulado com



micropartículas, houve um expressivo efeito residual quando comparado a formulação não encapsulada (Xentari®) (Figura 10<sup>a</sup>).



**Figura 10** - Resultados para os ensaios de persistência considerando valores de mortalidade (A-F) e de concentração de esporo (G-L).

Com 80 horas após a aplicação a formulação microencapsulada apresentava uma taxa de mortalidade de  $67,5 \pm 3,8$  %, enquanto a formulação comercial apresentava  $32,4 \pm 4,0$ % de mortalidade, respectivamente (Figura 10). Esse resultado refletiu nos valores de área sob a curva, onde a formulação de micropartícula e comercial apresentaram uma área de  $7283 \pm 119$  e  $4383 \pm 107$ , respectivamente (Tabela 3). O maior efeito residual está diretamente associado a capacidade de proteção e encapsulação dessas matrizes. Isto também fica evidenciado, quando analisamos para as mesmas amostras os valores de

concentração de esporos. Apesar de uma menor diferença em função do tempo, a área sob a curva para a concentração de esporos também foi significativamente maior para a formulação de micropartículas quando comparado a formulação comercial, apresentando uma área de  $9,89 \pm 0,56 \times 10^8$  e  $7,07 \pm 0,46 \times 10^8$ , respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3:** Valores de área na curva para os ensaios de persistência, considerando mortalidade e também concentração de esporos

Tratamentos	Área sob a curva	Área sob a curva $10^8$
	(Mortalidade x Tempo)	(Concentração esporos x Tempo)
Xentari®	4383 (4172 – 4593) a	7,07 (5,97 – 8,16) a
MP_Bta	7283 (7050 – 7517) b	9,89 (9,03 – 10,79) b
MP_Bta + 1% Lig	4932 (4689 – 5176) a	7,55 (5,69 – 9,41) a
MP_Bta + 2% Lig	4278 (4085 – 4471) a	7,84 (6,14 – 9,54) a
MP_Bta + 1% AH	7211 (6977 – 7446) b	7,99 (6,52 – 9,46) a
MP_Bta + 2% AH	6509 (6271 – 6746) c	6,58 (5,51 – 7,65) a
Dipel®/ Xentari®	4675 (4454 – 4897) a	7,55 (6,08 – 9,01) a
MP_Btk/Bta	4571 (4349 – 4792) a	9,42 (7,88 – 10,92) b
MP_Btk/Bta + 1% Lig	3722 (3482 – 3962) d	7,49 (6,17 – 8,81) a
MP_Btk/Bta + 2% Lig	3119 (2892 – 3346) d	6,48 (5,46 – 7,50) a
MP_Btk/Bta + 1% AH	3112 (2882 – 3343) d	7,02 (5,67 – 8,37) a
MP_Btk/Bta + 2% AH	2869 (2629 – 3109) d	6,91 (5,67 – 8,14) a

Os valores de mortalidade designados pelas mesmas letras dentro de uma coluna para cada espécie não são significativamente diferentes entre si,  $p < 0,05$ .

Quando foram adicionados os agentes fotoprotetores (Lignina e Ácido húmico) as formulações de micropartículas, pode-se observar que apenas para o ácido húmico ocorreu um efeito residual significativo. Ao serem comparados os valores de área sob a curva, a formulação contendo 1% de AH não apresentou diferença significativa da formulação microencapsulada, já a formulação contendo 2% de AH, apresentou valor significativamente diferente da formulação comercial não encapsulada, mas valor significativamente menor que apenas a formulação microencapsulada. Para a lignina não foram observadas diferenças significativas entre as formulações em ambas concentrações. A adição dos agentes protetores também não causou efeito significativo sob a concentração de esporos. Estes resultados podem ser observados também na Figura 10, onde sob condições de exposição externa, que as micropartículas foram capazes de proteger o organismo de uma degradação, assim como

observado na Figura 10D, o ácido húmico mostrou-se um importante composto fotoprotetor.

Já, para as formulações contendo a mescla de *Bacillus thuringiensis kurstaki/Bacillus thuringiensis aizawai* (60:40) (Figura 10 – D-F e J-L) podemos observar que não ocorreram variações significativas na persistência quando comparamos a formulação de micropartículas, a formulação comercial e também a formulação de micropartículas com adição dos agentes fotoprotetores. Isto também fica evidenciado nos resultados de concentração de esporos.

#### 4. DISCUSSÃO

A lignina apresentou eficiência fotoprotetora, que pode ser explicada por uma capacidade de absorção de UV (Kaiser; 2018). Esses resultados corroboram com os encontrados por JE L e Behle, (2005), em que conídios revestidos com lignina reticulada, também mostraram alta proteção UV, porém, diferente desse artigo, a formulação apresentou efeitos reduzidos contra seu inseto alvo.

O ácido húmico mostrou-se um importante composto fotoprotetor. Bitton et al., (1972) também constatou eficiência ao testar o ácido húmico como fotoprotetor em bactérias. O mesmo pôde ser observado por Kaiser et al., (2019), que ao realizar o microencapsulamento da *Beauveria bassiana*, apresentou fotoproteção de 90% dos conídios expostos, em relação aos não encapsulados, em condições de laboratório, e 87% em condições de campo. Segundo Bitton, (1972) a proteção conferida pelo ácido húmico, pode ser devido a sua capacidade de absorver as radiações solares, reduzindo a quantidade de energia que atinge as células.

Segundo Pozsgay et al., (1987), após 48h horas de exposição à radiação solar, 30% do triptofano e 20% de histidina de proteínas Cry, são quebradas, diminuindo sua eficiência inseticida. Na figura 10, é possível observar que após 48h de aplicação, ocorre uma queda no percentual de mortalidade das larvas, porém, nas formulações contendo Bta e ácido húmico, essa queda é menos acentuada, reafirmando essa característica fotoprotetora.

De maneira geral, podemos destacar que a microencapsulação de Bt, pode ser uma importante estratégia a fim de aumentar a persistência em campo



de Bt. Acreditamos ainda, que formulações mais eficientes podem ser obtidas com a mescla de organismos microencapsulados e não encapsulados. Tais formulações (alvos de estudos futuros) permitiriam uma liberação imediata do ingrediente ativo, com um controle no primeiro momento, e uma liberação gradativa, havendo um residual no campo, aumentando a eficiência de controle, possibilitando diminuir o número de aplicações.

## 5. CONCLUSÕES

A adição de fotoprotetores não promoveu um incremento em mortalidade, as matrizes de forma individual tiveram um resultado satisfatório de proteção. Diante disso, o uso de fotoprotetores pode ser posicionado como adjuvante.

O trabalho mostra que se têm a necessidade de realizar mais estudos sobre materiais para o encapsulamento, bem como, fotoprotetores e as quantidades que devem ser adicionadas as formulações.

## REFERÊNCIAS

Barcellos GA, Hanich MR, Pretto VE, Weschenfelder MA, Horikoshi RJ, Dourado PM, Ovejero RFL, Berger GU, Martinelli S, Head GP, Bernardi O (2023) Characterizing the lethal and sub-lethal effects of genetically modified soybean expressing Cry1A. 105, Cry2Ab2, and Cry1Ac insecticidal proteins jornal21 *Spodoptera species* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 79(2):548-559.

Behle RW, Tamez-Guerra P, McGuire MR (2003) Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. **Journal of Economic Entomology** 96: 1066–1075.

Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701x MON 89788 soybean jornal21 *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68(7):1083-1091.

Bitton G, Henis Y, Lahav N (1972) Efeito de vários minerais de argila e ácido húmico na sobrevivência de *Klebsiella aerogenes* expostos à irradiação ultravioleta. **Applied Microbiology** 23:870-874.

Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest management Science** 75(10):2682-2689.

Borges R (2011) **Evaluation and selection of new toxic bait formulations for *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) tested in laboratory and apple orchards.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages.

Campos EV, Proença PL, Oliveira JL, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF (2019) Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators** 105:483-495.

Cantwell GE, Franklin BA (1966) Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 8(2):256-258.

Chandrasena DI, Signorini AM, Abratti G, Storer NP, Olaciregui ML, Alves AP, Pilcher CD (2018) Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F  $\delta$ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest of management science** 74(3):746-754.

Chattopadhyay P, Banerjee G, Mukherjee S (2017) Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **Biotechnology** 37:1-11.

Cohen E, Rozen H, Joseph T, Braun S, Margulies L (1991) Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet irradiation. **Journal of Invertebrate Pathology** 57(3):343-351.

da Silva SCM, da Silva IF, Ávila CJ, de Oliveira HN (2020) Anticontaminants to replace formaldehyde in an artificial diet used for rearing the sugarcane borer can affect the parasitoids performance?. **International Journal of Tropical Insect Science** 40(4): 1079-1084.

Day R, Abrahams P, Bateman M, Beale T, Clotey V, Cock M, Colmwnarez Y, Corniani N, Early R, Godwin J, Gomes J, Moreno PG, Murphy ST, Oppong-

Mensah B, Phiri N, Pratt C, Silvestri S, Witt A (2017) Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Management** 28(5):196-201.

De Oliveira JL, Fraceto LF, Bravo A, Polanczyk RA (2021) Encapsulation strategies for *Bacillus thuringiensis*: From now to the future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 69(16): 4564-4577.

Edosa TT, Dinka TD (2021) Current and future potential distribution, risk and management of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Innovative Agriculture** 8: 14-23.

EUROPEAN COMMISSION. **Maximum Residue Levels | Food Safety**. Disponível em: <[https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/maximum-residue-levels_en)> Acesso em: 24.10.2022

Farias JR, Horikoshi RJ, Santos AC, Omoto C (2014) Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology** 107(6):2182-2189.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (FAO), **Global Action for Fall Armyworm Control**. Disponível em: <[fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/](http://fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/faw-map/en/)> Acesso em: 24.10.2022

Garlet CG, Gubiani PDS, Palharini RB, Moreira RP, Godoy DN, Farias JR, Bernardi O (2021) Field-evolved resistance to chlorpyrifos by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Inheritance mode, cross-resistance patterns, and synergism. **Pest Management Science** 77(12):5367-5374.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age?. **Trends in biotechnology** 30(5): 250-258.

Hawkins NJ, Bass C, Dixon A, Neve P (2019) The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews** 94(1):135-155.

Horikoshi RJ, Bernardi O, Fernando SDA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) resistant to Bt maize. **Journal of invertebrate pathology** 161:1-6.

Ignoffo CM, Hostetter DL, Sikorowski PP, Sutter G, Brooks WM (1977) Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology** 6(3):411-415.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Dilema no uso de defensivos agrícolas: diferenças nas práticas e políticas ligadas aos limites máximos de resíduos. N.37, 2021. Disponível em: [http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10921/1/NT\\_37\\_Dinte\\_Dilemas\\_Uso\\_Defensivos\\_Agricolas.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10921/1/NT_37_Dinte_Dilemas_Uso_Defensivos_Agricolas.pdf)> Acesso em: 24.10.2022

Iqbal N, Hazra D, Purkait A, Bharati S, Kumar N, Kumar J (2020) Bioengineering of neem colloidal nano-emulsion formulation with adjuvant for better surface adhesion and long term activity in insect control. **PREPRINT (Version 1) available at Research Square**, 10.

Jacobs A, Van Vuuren A, Rong IH (2018) Characterisation of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) from South Africa. **African Entomology** 26(1):45-49.

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL (2014) *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of invertebrate pathology** 122:52-54.

Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré J (2021) Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 66:121-140.

Kaiser D, Bacher S, Mène-Saffrané L, Grabenweger G (2019) Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. **Pest management science** 75(2):556-563.

Kala S, Sogan N, Agarwal A, Naik SN, Patanjali PK, Kumar J (2020) Biopesticides: Formulations and delivery techniques. In.: Egbuna C, Sawicka B (Eds.) **Natural remedies for pest, disease and weed control**. Academic Press, p. 209–220.

Kijlstra J, Patel S, Ide A, Hartmann-Wittulsky S (2021) U.S. Patent Application No. 17/264,199.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1–41.

Lade BD, Gogle DP, Lade DB, Moon GM, Nandeshwar SB, Kumbhare SD (2019) Nanobiopesticide formulations: Application strategies today and future perspectives. In: Koul O (Ed.) **Nano-biopesticides today and future perspectives**. Academic Press. p. 179-206.

Leland JE (2001) **Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African desert locust (*Schistocerca gregaria*)**. 24f. Dissertação. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Leland JE , Behle RW (2004) Formulation of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, with resistance to UV degradation for control of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. In: Dugger P, Richter DA (Eds.) *Proceedings, Beltwide Cotton Conference*. National Cotton Council, Memphis TN. p 1800 – 1808 .

Leong KLH, Cano RJ, Kubinski AM (1980) Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. **Environmental Entomology** 9(5):593-599.

Mishra J, Tewari S, Singh S, Arora NK (2014) Biopesticides: where we stand?. **Plant microbes symbiosis: applied facets** 37-75.

Mohan M, Gujar GT (2001) Toxicidade de cepas e formulações comerciais de *Bacillus thuringiensis* à traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.). **Proteção de Culturas** 20(4):311-316.

Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology** 26(2): 286-300.

Moreira SCS, Silva IF, Ávila CJ, Oliveira HN (2020) Anticontaminantes alternativos como substitutos ao formaldeído na dieta artificial para criação de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Communications** 2:ec02015.

Nascimento J, Goncalves KC, Dias NP, de Oliveira JL, Bravo A, Polanczyk RA (2022) Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural

systems and new approaches to improve their use in Brazil. **Biological Control** 165:104792

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018) Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science** 74(6):1441-1448.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science** 72(9):1727-1736.

O'Sullivan JJ, Norwood EA, O'Mahony JA, Kelly AL (2019) Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. **Journal of food engineering** 243:57-69.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins** 6(12):3296-3325.

Paredes-Sánchez FA, Rivera G, Bocanegra-García V, Martínez-Padrón HY, Berrones-Morales M, Niño-García N, Herrera-Mayorga V (2021) Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. **Molecules** 26(18):5587.

Paulo F, Santos L (2017) Design of Experiments for Microencapsulation Applications: A Review. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications** 77:1327–1340.

Peralta, C., Palma, L. (2017). Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins**, 9(1): 39.

Perini CR, Tabuloc CA, Chiu JC, Zalom FG, Stacke RF, Bernardi O, Nelson DR, Guedes JC (2021) Transcriptome Analysis of Pyrethroid-Resistant *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) Reveals Overexpression of Metabolic Detoxification Genes. **Journal of Economic Entomology** 1:274-283.

Pogue MG (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae). **American Entomological Society** 1–202

Polanczyk RA, Alves SB, Padulla LF (2005) Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Biopesticides International** 1(1): 2.

Posadas JB, Maricel AL, Mini Jorge I, Lecuona ER (2012) Natural tolerance to UV-B and assessment of photoprotectants in conidia of six native isolates of *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuillemin. **World Applied Sciences Journal** 20(7):1024-1030.

Pozsgay M, Fast P, Kaplan H, Carey PR (1987). The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: A Raman spectroscopic study. **Journal Invertebrate Pathology** 50:246-253.

Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T, Carey PR (1991) The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. **Biochemical Journal** 273(1):43-47.

Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of invertebrate pathology** 88(1):1-7.

Shasha BS, McGuire MR, Behle RW (1998) Lignin-based pest control formulations . US Patent 5750467.

Stacke RF, Godoy DN, Halberstadt SA, Bronzatto ES, Giacomelli T, Hettwer BL, Muraro DS, Guedes JVC, Bernardi O (2020) Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance, fitness costs and cross-resistance to other pyrethroids in soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection** 131.

Sun XX, Hu CX, Jia HR, Wu QL, Shen XJ, Zhao SY, Jiang YY, Wu KM (2021) Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture** 20(3):664-672.

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology** 39(1):47-79.

Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Hamm JJ, Sumner RH, Shasha SS (2000) Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculoviruses isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 93:210–218.

Vassilev N, Vassileva M, Martos V, Garcia del Moral LF, Kowalska J, Tylkowski B, Malusá E (2020) Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. **Frontiers in plant Science** 11: 270.

Wakefield ME (2018) Microbial biopesticides. **Recent advances in stored product protection** 143-168.

Wu QL, He LM, Shen XJ, Jiang YY, Liu J, Hu G, Wu KM (2019) Estimation of the potential infestation area of newly-invaded fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in the Yangtze River Valley of China. **Insects** 10(9):298.

Zhang JT, Yan JP, Zheng DS, Sun YJ, Yuan ZM (2008) Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of applied microbiology** 105(1):151-157.

..



## **CAPÍTULO 4 – Considerações finais**

Para que um processo de encapsulamento de formulações a base de microrganismos seja eficiente, é essencial que a metodologia e o material de parede utilizados sejam adequados e compatíveis. A partir dos resultados apresentados no presente estudo, foi possível observar que tanto os materiais de parede como a metodologia utilizada no processo de encapsulamento do Bt, foram adequados e não afetaram negativamente a atividade tóxica do microrganismo.

Esperava-se que as formulações encapsuladas com o protetor térmico (ácido húmico e lignina), nas duas concentrações, apresentassem maior persistência quando comparadas as formulações encapsuladas apenas com polissacarídeos. Porém, o residual em campo dos dois tipos de formulações (com e sem protetores térmicos) foram em nível semelhante, o que conclui que sua utilização, não alteraram o resultado de forma que fosse compensatório sua utilização, sendo necessárias mais pesquisas e testes na utilização de outros materiais como protetores térmicos, para resultados mais significativos.

Além disso, a pesquisa possibilitou o teste apenas de contagem de esporos, não sendo possível verificar a proteção térmica quanto ao cristal, que é o maior responsável pela atividade tóxica, para um estudo mais completo, é importante que essa verificação seja realizada.