

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DE NOVALURON, GLIFOSATO E *Metarhizium rileyi*
SOBRE O SISTEMA IMUNE, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E
METABOLISMO REDOX DE Anticarsia gemmatalis

ANA PAULA VARGAS VISENTIN

CAXIAS DO SUL
2017

ANA PAULA VARGAS VISENTIN

**EFEITOS DE NOVALURON, GLIFOSATO E *Metarhizium rileyi* SOBRE O SISTEMA
IMUNE, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E METABOLISMO REDOX DE
*Anticarsia gemmatilis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientadora: Prof^a Dra. Lúcia R Bertholdo-Vargas

CAXIAS DO SUL

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

V829e Visentin, Ana Paula Vargas

Efeitos de novaluron, glifosato e *Metarhizium rileyi* sobre o sistema imune, parâmetros biológicos e metabolismo redox de *Anticarsia gemmatilis* / Ana Paula Vargas Visentin. – 2017.

82 f.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Neiva Monteiro de Barros.

Coorientação: Lúcia Rosane Bertholdo Vargas.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Pragas - Controle. 3. Fungos entomopatogênicos. 4. Estresse oxidativo. 5. Lagartas. I. Barros, Neiva Monteiro de, orient. II. Vargas, Lúcia Rosane Bertholdo, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 632.95

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

ANA PAULA VARGAS VISENTIN

EFEITOS DE NOVALURON, GLIFOSATO E *Metarhizium rileyi* SOBRE O SISTEMA
IMUNE, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E METABOLISMO REDOX DE
Anticarsia gemmatilis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção do título de
Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientadora: Prof^a Dra. Lúcia R. Bertholdo-Vargas

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 DE DEZEMBRO DE 2017.

Orientador: Prof^a. Dra. Neiva Monteiro de Barros

Co-orientadora: Prof^a Dra. Lúcia R Bertholdo- Vargas

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Prof^a. Dra. Lídia Mariana Fiuza

Prof^a. Dra. Mariana Roesch Ely

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente nada teria sido possível;

À Dra. Neiva Monteiro de Barros, pelos ensinamentos, confiança, incentivo, amizade e principalmente por sua paciência ao me orientar;

À Dra. Lúcia Bertholdo-Vargas, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e ajuda nesse trabalho;

À Camila Bonatto Vicenço por todo empenho, dedicação e amizade.

Ao Ms. Aaron Machado pela amizade e enorme ajuda nesse trabalho. Muito obrigada mesmo!

À Geórgia Chedid Costi, Rafaela Andressa Thomazoni, Rahyssa Chagas Hahn, pela ajuda durante os bioensaios, sem as quais, não seria possível a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Mariana Roesch Ely coordenadora do Laboratório Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA pelo empréstimo do microscópio de fluorescência para a análise das lâminas.

À Dra. Miriam Salvador coordenadora do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante pela parceria na realização dos testes referentes ao metabolismo redox.

À Dra. Taísa Dal Magro pela análise estatística.

Ao Dr. Edgar Frozza pela agilidade e dedicação nas correções.

À toda equipe do Laboratório de Controle de Pragas da Universidade de Caxias do Sul por ter contribuído de alguma forma nesse trabalho.

A minha mãe Lola, meu infinito agradecimento. Sempre acreditou em minha capacidade e me achou A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada!

À meu esposo, Gustavo, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, compreensão, apoio e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

À todos os meus amigos e familiares que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

*“Nenhuma atividade no bem é insignificante...
As mais altas árvores são oriundas de minúsculas sementes.”*

Chico Xavier

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Manejo Integrado na cultura da soja.....	5
3.2 Sistemas de defesa dos insetos.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Lagartas.....	17
4.2 Inseticida Químico	17
4.3 Herbicida.....	17
4.4 Fungo Entomopatogênico	18
4.5 Avaliação dos efeitos do fungo <i>Metarhizium rileyi</i> e agroquímicos sobre <i>Anticarsia gemmatilis</i>	18
4.5.1 Identificação e quantificação dos hemócitos	18
4.5.2 Avaliação dos parâmetros biológicos	19
4.5.3 Determinação de marcadores do metabolismo redox	20
4.5.3.1 Proteínas totais.....	20
4.5.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	20
4.5.3.3 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)	21
4.5.3.4 Atividade enzimática da Catalase (CAT)	21
4.5.3.5 Determinação do Óxido Nítrico.....	22
4.6 Avaliação da sensibilidade do fungo entomopatogênico ao glifosato e novaluron	22
4.6.1 Cultivo dos fungos em meio contendo os agroquímicos	22
4.6.2 Quantificação de colônias, avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Metarhizium rileyi</i>	23
4.7 Análise estatística	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Identificação e quantificação dos hemócitos	25

5.2 Avaliação dos parâmetros biológicos	40
5.3 Determinação de marcadores do metabolismo redox	47
5.4 Sensibilidade do fungo entomopatogênico <i>Metarhizium rileyi</i> ao glifosato e novaluron	51
6. DISCUSSÃO GERAL.....	58
7. CONCLUSÕES	63
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	64
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número total de hemócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (células/mm ³) alimentadas com dieta artificial acrescida do inseticida novaluron.....	25
Tabela 2. Número total de hemócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (células/mm ³) em ensaios com o fungo e com o herbicida no 8º, 10º e 12º dia.	26
Tabela 3. Número de plasmócitos, prohemócitos e oenócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , avaliados aos 3 e 5 dias após exposição à dietas contendo novaluron em diferentes concentrações.....	31
Tabela 4. Número de esferulócitos, adipohemócitos e granulócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , avaliados aos 3 e 5 dias após exposição à dietas contendo novaluron em diferentes concentrações.....	32
Tabela 5. Número de plasmócitos, esferulócitos e granulócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , avaliados aos 8, 10 e 12 dias em ensaios com o fungo e com o herbicida.	34
Tabela 6. Número de prohemócitos, oenócitos e adipohemócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , avaliados aos 8, 10 e 12 dias em ensaios com o fungo e com o herbicida.	37
Tabela 7. Dia em que ocorreu a troca do 4º, 5º e 6º ínstar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentadas com dieta artificial acrescida de agentes químicos e em contato com o agente biológico.	41
Tabela 8. Dia que a lagarta <i>Anticarsia gemmatalis</i> atingiu a fase de pré-pupa, pupa e adulto, após a exposição ao fungo e dieta contendo glifosato.	42
Tabela 9. Tempo necessário para completar o ciclo de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , após a exposição à dietas contendo diferentes produtos e concentrações.	43
Tabela 10. Parâmetros morfométricos de pupas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , após a exposição ao fungo <i>Metarhizium rileyi</i> e alimentadas com dieta contendo glifosato.	43
Tabela 11. Índice e tempo de mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> após exposição ao fungo e alimentadas com dieta acrescida de glifosato e novaluron.	44
Tabela 12. Crescimento micelial e esporulação de <i>Metarhizium rileyi</i> , relativo ao controle, em Saboraud Maltose Ágar (SMAy) acrescido de inseticida e herbicida.	52
Tabela 13. Percentual de colônias de <i>Metarhizium rileyi</i> , relativo ao controle, desenvolvidas em meio de cultura Sabouraud Maltose Ágar (SMAy) contendo inseticida e herbicida.	54
Tabela 14. Percentual de colônias de <i>Metarhizium rileyi</i> , relativo ao controle, desenvolvidas em meio de cultura Sabouraud Maltose Ágar (SMAy) contendo novaluron e glifosato.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de hemócitos em <i>Anticarsia gemmatalis</i> : a. Oenócito; b. Prohemócito; c: Plasmócito	29
Figura 2. Tipos de hemócitos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> : a. Granulócito; b. Esferulócito; c. Adipohemócito.	30
Figura 3. Lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> mortas pela ação do inseticida novaluron. a) Ação do inseticida no epitélio intestinal. b) Ação do inseticida na ecdise	44
Figura 4. Número de ovos por fêmea de <i>Anticarsia gemmatalis</i> provenientes de bioensaios com o fungo e de ensaios com dieta contendo herbicida e inseticida.	45
Figura 5. Ovo de <i>Anticarsia.gemmatalis</i> antes da eclosão (A) e após a eclosão (B).	46
Figura 6. Percentual de eclosão de ovos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , em ensaios com o fungo e com dieta contendo glifosato.	46
Figura 7. Pupa (a) e adulto (b) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> com malformação ocasionada pela ação do glifosato.	47
Figura 8. (a) Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e (b) óxido nítrico em <i>Anticarsia gemmatalis</i> , avaliado aos 8, 10 e 12 dias após exposição a dieta com diferentes concentrações de glifosato.	48
Figura 9. (a) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e (b) catalase (CAT) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , avaliado aos 8, 10 e 12 dias após exposição a dieta com diferentes concentrações de glifosato.	49
Figura 10. Crescimento micelial do fungo <i>Metarhizium rileyi</i> em diferentes concentrações de glifosato.	53
Figura 11. Esporulação de <i>Metarhizium rileyi</i> em meio SMAy com novaluron e glifosato ...	53
Figura 12. Sensibilidade de <i>Metarhizium rileyi</i> ao herbicida glifosato. a) Controle; b) Concentração 12,5% DR; c) Concentração 25% DR; d) Concentração 50% DR; e) Concentração 100% DR	55

NOMENCLATURA

AD: Adipohemócito

CAT: Catalase

CDH: Contagem diferencial de hemócitos

CHS: Quitina sintase

CTH: Contagem total de hemócitos

DR: dose recomendada

EPSPS: Enzima 5-enolpiruvil-3shikimato-fosfato-sintase

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ES: Esferulócito

FAO: Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

FERP: Proteínas relacionadas à fibrinogênio

GNBPs: Proteínas de ligação Gram- negativas

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Granulócito

GST: Glutathione-S-transferase

IARC: Agência Internacional para Investigação sobre câncer

IMEA: Instituto Mato- Grossense de Economia Agropecuária

NPS: Nitroprussiato de sódio

OE: Oenócito

ON: Óxido nítrico

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PL: Plasmócito

PO: Fenoloxidase

PPO: Profenoloxidase

PR: Prohemócito

PRRS: Padrões de reconhecimento de receptores

SMAy: Sabouraud Maltose Ágar

SOD: superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TDAH: Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade

TRXR: Tioredoxina redutase

WHO: Organização Mundial da Saúde

RESUMO

O sucesso na implementação de programas efetivos de manejo integrado de pragas necessita da compreensão do mecanismo de ação de agentes de controle e agroquímicos sobre os insetos e sua compatibilidade. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ) é uma das principais pragas da cultura de soja do mundo, causando grandes perdas para a produção agrícola. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações que ocorrem no sistema imune, parâmetros biológicos e metabolismo redox em *A. gemmatalis* quando infectada pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* e em tratamentos com novaluron e glifosato. Para tal foram realizados bioensaios para a contagem total (CTH) e diferencial (CDH) de hemócitos, avaliação dos parâmetros biológicos e efeitos secundários, análise do metabolismo redox por meio da atividade da enzima superóxido dismutase e catalase e níveis de óxido nítrico em *A. gemmatalis*, além da sensibilidade do fungo entomopatogênico aos agroquímicos novaluron e glifosato. As maiores alterações no sistema imune dos insetos foram observadas com novaluron, sendo que os hemócitos não foram eficazes, gerando um colapso no sistema imune. O inseticida afetou a esporulação e o crescimento micelial de *M. rileyi*. Nas avaliações com *M. rileyi*, na menor concentração ($1 \cdot 10^7$ conídios/mL) evidenciou-se aumento no número de células de defesa sugerindo que o sistema imune foi capaz de atenuar a ação do entomopatógeno. A ação do glifosato no sistema imune dos insetos foi mais discreta, sendo que logo após a infecção este é ativado e atua na eliminação da molécula. Além disso, observou-se que o mesmo gerou alterações no sistema antioxidante das lagartas por meio de análises do metabolismo redox, juntamente com malformações em pupas e adultos. O herbicida também afetou o crescimento micelial e a esporulação do fungo entomopatogênico, podendo comprometer sua eficácia. Dessa forma sugere-se mais estudos relacionados ao intervalo de exposição entre os dois agentes a fim de que possam ser utilizados sem que ocorram interferências nos seus respectivos mecanismos de ação.

Palavras-chave: agroquímicos, controle de pragas, fungo entomopatogênico, estresse oxidativo, lagarta-da-soja

ABSTRACT

Success in implementing effective integrated pest management programs requires understanding the action mechanisms of control agents and agrochemicals on insects and their compatibility. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ) is one of the most important pests of the world's soybean crop, causing major losses to agricultural production. The objective of the present study was to evaluate the changes that occur in the immune system, biological parameters and redox metabolism in *A. gemmatalis* when infected by entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* and under treatments with novaluron and glyphosate. For this purpose, were performed bioassays for total (THC) and differential (DHC) hemocytes count, evaluation of biological parameters and secondary effects, analysis of redox metabolism by superoxide dismutase and catalase enzyme activities and nitric oxide levels in *A. gemmatalis*, as well as the sensitivity of entomopathogenic fungus to agrochemicals novaluron and glyphosate. The major changes in the insect's immunity were observed with novaluron, and the hemocytes were not effective, generating a collapse in the immune system. The insecticide affected the sporulation and mycelial growth of *M. rileyi*. Regarding the evaluations with *M. rileyi*, there was an increase in the number of defense cells at lower concentration (1.10^7 conidia/mL) suggesting that immune system was able to attenuate the entomopathogenic action. Action of the glyphosate on insect's immunity was slighter, and soon after the infection the system is activated, acting in elimination of the molecule. Moreover, it was observed that the glyphosate also caused changes on caterpillar's antioxidant system by means of redox metabolism analyzes, along with malformations in pupae and adults. The herbicide also affected mycelial growth and sporulation of the entomopathogenic fungus, which may compromise its effectiveness. In this way, more studies related to the interval of the exposure between the two agents are suggested so that they can be used without interferences in their respective mechanisms of action.

Keywords: agrochemical, pest control, entomopathogenic fungus, oxidative stress, soybean caterpillar

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma planta da família *Fabaceae*, originária da China e do Japão. É um grão muito versátil dando origem a produtos e subprodutos utilizados na agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana compõe produtos embutidos, chocolates, temperos, pães, massas. Também é componente fundamental na fabricação de rações animais como o farelo de soja. No entanto, seu uso mais conhecido é como óleo refinado (Silva *et al.*, 2011; Embrapa, 2016a). Atualmente, a oleaginosa vem sendo estudada como uma possibilidade de combustível. O biodiesel de soja já se encontra em testes por instituições de pesquisa em algumas cidades brasileiras (MMA, 2016).

O agronegócio brasileiro é moderno, eficiente e competitivo. O Brasil lidera o ranking mundial de exportação do complexo soja (farelo, óleo e grão), sendo o segundo maior produtor mundial desta leguminosa, tendo assim uma grande importância econômica, com muitas possibilidades de expansão (USDA, 2015; FIESP, 2017).

Os avanços da tecnologia são visíveis na cultura da soja, visto que os índices de produtividade tiveram uma considerável ascensão. Na safra 2016/2017, a produção foi de cerca de 115 milhões toneladas, gerando safra recorde (IBGE, 2017). Mesmo diante de tal evolução no setor, as pragas continuam sendo um problema abrangente, tornando-se necessário o uso constante de inseticidas como é o caso do novaluron e herbicidas como o glifosato. Segundo o Instituto Mato- Grossense de Economia Agropecuária (IMEA), o uso de inseticidas na safra 2017/2018, acarretará num custo de cerca de 10% na produção, percentual esse considerado muito elevado.

Na cultura da soja, a principal praga é a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebiidae), a qual se alimenta de folhas, em alguns casos podendo gerar 100% do desfolhamento, em consequência, prejudicando o enchimento das vagens e assim a

quantidade de grãos a ser produzida (Moscardi *et al.*, 2012). Dentre as formas de controle da *A. gemmatilis*, a mais comum ainda é a aplicação de agroquímicos, sendo um deles o Rimon SUPRA[®], um inseticida fisiológico capaz de inibir a síntese da quitina do inseto.

Além do uso de inseticidas são aplicados ainda no manejo da soja, herbicidas como Roundup WG[®], cujo princípio ativo é o glifosato, que age através da inibição da enzima 5-enolpiruvil-3shiquimato-fosfato-sintase (EPSPS), envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos, responsáveis por funções essenciais nas plantas (Stephenson *et al.*, 2006), afetando o equilíbrio biológico das espécies, além de causar alterações no metabolismo redox e parâmetros biológicos de organismos não alvo (Monserrat *et al.*, 2007; Scheneider *et al.*, 2009).

O controle biológico é usado como uma alternativa para o controle da praga, visando à redução do uso de agrotóxicos. Esta é uma tecnologia limpa e efetiva no manejo de pragas através do uso de inimigos naturais. Entre os agentes de controle biológico destacam-se os fungos entomopatogênicos tais como *Metarhizium rileyi*, (Farlow) Kepler, SA Rehner & Humber, 2015, por não precisarem ser ingeridos para causar morte do hospedeiro (Erthal Júnior, 2011; Lenteren, 2012; Embrapa, 2014).

O sucesso na implementação de programas efetivos de manejo integrado de pragas necessita da compreensão do mecanismo de ação de agentes de controle e agroquímicos sobre os insetos e sua compatibilidade. Estes mecanismos podem estar relacionados à alterações no sistema imune, metabolismo redox e parâmetros biológicos. Acredita-se ainda que os agroquímicos possuam um potencial genotóxico maior quando comparados aos agentes de controle biológico, além de não serem seletivos e específicos, podendo afetar uma série de inimigos naturais, ocasionando desequilíbrio biológico e ainda poluir a água e o solo.

Programas de controle de insetos-praga na agricultura visam redução ou inibição da oviposição e a alimentação do inseto e, conseqüentemente diminuição da população da praga

e de danos econômicos. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivos avaliar as alterações que ocorrem nos hemócitos, nos parâmetros biológicos e de defesa antioxidante de *A. gemmatilis*, quando infectadas pelo fungo *M. rileyi* e em tratamentos com novaluron e glifosato bem como determinar a sensibilidade do entomopatógeno aos agroquímicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações que ocorrem no sistema imune, parâmetros biológicos e metabolismo redox em *A. gemmatalis* quando infectadas pelo fungo *M. rileyi* e em tratamentos com novaluron e glifosato.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a contagem total dos hemócitos de *A. gemmatalis* e comparar alterações no número de células da hemolifa entre os diferentes tipos de tratamento e o controle.
- Identificar morfologicamente e quantificar os tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de lagartas de *A. gemmatalis*.
- Quantificar os diferentes tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de lagartas de *A. gemmatalis* quando infectadas pelo fungo *M. rileyi* e tratadas com novaluron e glifosato.
- Avaliar os efeitos secundários sobre parâmetros biológicos em *A. gemmatalis* submetidas aos diferentes tratamentos.
- Avaliar os danos oxidativos à lipídios e proteínas, níveis de óxido nítrico e sistemas de defesa antioxidante induzidos por glifosato em *A. gemmatalis*.
- Avaliar a sensibilidade do fungo *M. rileyi* ao glifosato e novaluron.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Manejo Integrado na cultura da soja

A ascendente produção de soja no Brasil faz com que seja o principal grão para o agronegócio, gerando assim números expressivos para economia brasileira, impulsionando o crescimento do país. Porém, as pragas e doenças ainda são sinônimo de grandes problemas para os produtores, causando perdas em larga escala (Schlesinger, 2004; Embrapa, 2016b).

Estima-se que os insetos podem causar uma perda de 15,6% da produção agrícola (Kreycki & Menten, 2013). Com a finalidade de evitar o aumento desses prejuízos, o uso de agrotóxicos ocorre de forma abusiva, fazendo com que o Brasil ocupe o primeiro lugar no *ranking* mundial de consumidores destes produtos (Peres & Moreira, 2007; Sohn, 2014).

Os inseticidas mais utilizados atualmente são os fisiológicos. Esses são inibidores da síntese de quitina, atuando diretamente na ecdise, fazendo com que as lagartas não efetuem a muda (Cessa *et al.*, 2013). Como exemplo desses inseticidas pode-se citar Dimilin[®], Nomolt[®], Alsystem[®] e Rimon[®]. O Rimon SUPRA[®], um dos mais utilizados, é do grupo químico benzoiluréia tendo como princípio ativo novaluron. Este inseticida é indicado para aplicação na parte aérea da planta com no máximo duas aplicações por safra com intervalo mínimo de cerca de 15 dias e intervalo de segurança de 53 dias. Sua ação ocorre entre 3 a 5 dias após a pulverização, sendo recomendada a aplicação para insetos no 1º e 2º ínstar de desenvolvimento, quando ainda não há prejuízos à cultura (Adama, 2015). Novaluron possui um período de persistência longo e atua em um número restrito de insetos, em especial lepidópteros, dessa forma causando menor impacto aos inimigos naturais da lagarta (Ishaaya *et al.*, 1996; Cutler *et al.*, 2005).

Alguns inseticidas podem ocasionar efeitos sobre fungos entomopatogênicos, tais como a inibição da germinação e do desenvolvimento do tubo germinativo, como também causar mutações que alteram a patogenicidade ou virulência dos fungos (Borges & Nova,

2011). Porém, esses efeitos podem variar de acordo com a espécie/isolado do entomopatógeno utilizado e do produto testado (Tanzini *et al.*, 2002; Alizadeh *et al.*, 2007).

A partir da safra 2003/2004, foi autorizado no Brasil o plantio de soja transgênica (Ferment *et al.*, 2010). Esse tipo de cultivar foi facilmente introduzido e aceito por parte dos produtores, pois além de conferir altos índices de produtividade, possui um gene de resistência ao glifosato o que a torna tolerante ao uso deste herbicida, evitando assim, inúmeras ervas invasoras. Esse agroquímico é considerado de amplo espectro (Gianessi, 2008; Embrapa, 2016c). Este tem sido um dos únicos herbicidas a ser utilizado no controle de ervas daninhas nos cultivares de soja geneticamente modificada, correspondendo quase a metade do volume de todos os princípios ativos comercializados no Brasil (IBAMA, 2012; ANVISA, 2015).

O glifosato é o princípio ativo do Roundup WG[®], um herbicida não seletivo, de ação sistêmica e pós-emergente, altamente eficiente e descrito como de baixa toxicidade à humanos e perigoso ao meio ambiente (Amarante & Santos, 2002; Yamada & Castro, 2007; IARC, 2016; ANVISA, 2016). Sua ação ocorre pela inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), inibindo assim a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais à via do ácido chiquímico como a fenilalanina, tirosina e triptofano (Santos *et al.*, 1995; Sobral, 2003). Esta enzima não está presente em humanos e animais, por isso a menor toxicidade para estes.

Nos últimos anos, sua toxicidade vem fazendo parte de estudos e ensaios clínicos, os quais demonstraram elevado potencial de genotoxicidade, interferindo no sistema endócrino e alergênico em humanos expostos de forma crônica a este agroquímico (Penagos *et al.*, 2004; Hokanson *et al.*, 2007; Heras-Mendaza *et al.*, 2008; Gasnier *et al.*, 2009; Poletta *et al.*, 2009). Isso fez com que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária iniciasse em 2008 um processo de reavaliação da toxicidade do glifosato. Um estudo recente desenvolvido por pesquisadores

do Laboratório de Inteligência Artificial e Ciência da Computação do Instituto de Tecnologia de Massachusetts relata que 50% das crianças nascidas nos EUA, a partir do ano 2025 terão autismo, sendo esse não só um distúrbio neurológico genético, mas que pode ser ocasionado por fatores ambientais, como a exposição ao glifosato. O glifosato pode afetar o funcionamento da glândula pineal, além de favorecer a absorção de alumínio nos tecidos paralisando assim uma via da absorção dos aminoácidos e ainda alterar a rota do ácido chiquímico (mais conhecido como chiquimato) que está presente em algumas bactérias da nossa flora intestinal, as quais podem ser essenciais à nossa saúde (Samsel & Seneff, 2013).

Outros estudos indicam que o glifosato pode induzir alterações epigenéticas, ocasionando patologias tais como Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Hungtinton e síndrome de Rett, além de sugerirem forte correlação entre crianças com diagnóstico de déficit de atenção / transtorno de hiperatividade (TDAH) ou transtorno de déficit de atenção (ADD) (Bouchard *et al.*, 2010; Sagiv *et al.*, 2010; Wynder *et al.*, 2010; Gapp *et al.*, 2014).

A Agência Internacional para Investigação sobre Câncer (IARC), instituição especializada da Organização Mundial da Saúde apresentou em 2015 um relatório de um estudo conduzido em 11 países sobre os indícios de o glifosato ser um agente cancerígeno. As evidências dessa genotoxicidade foram baseadas em estudos *in vitro*, experimentos com animais e em humanos, classificando a substância como provável carcinogênico em humanos (IARC, 2016).

O glifosato também foi avaliado quanto aos efeitos em outros organismos não-alvo, como humanos, artrópodes e micro-organismos entomopatogênicos (Lundgren *et al.*, 2009; Scheneider *et al.*, 2009; ANVISA, 2017). Em fungos entomopatogênicos estudos demonstram que o uso de glifosato pode afetar o crescimento micelial, a produção e a viabilidade dos conídios (Costa *et al.*, 2004; Botelho & Monteiro, 2011).

Em estudo realizado por Botelho (2011), o herbicida glifosato afetou o crescimento e a produção dos conídios tanto de *Beauveria bassiana* como de *Metarhizium anisopliae*, ambos fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico. Resultado semelhante já havia sido encontrado por Andaló *et al.* (2004) observando redução significativa do crescimento micelial e da produção de conídios de *B. bassiana* em experimento *in vitro* com o mesmo herbicida. Costa *et al.* (2004) também constataram maior redução na produção de conídios de *M. anisopliae*, independente da dose de glifosato. O mesmo ocorre para os conídios do fungo *M. rileyi* (Dutra *et al.*, 2013; Sosa-Gomez, 2005).

Apesar dos agrotóxicos ainda serem muito utilizados nas lavouras, outras formas de controle estão sendo adotadas devido à resistência dos insetos (Miranda *et al.*, 2007; Erthal Júnior, 2011). O controle biológico é um método que envolve a utilização de inimigos naturais como micro-organismos, parasitóides e predadores (Alves, 1998; Berti Filho & Ciociola, 2002; Ouda, 2014). Este é um método bastante vantajoso, pois causa menor impacto ambiental, possui alta especificidade e em caso de resistência esta ocorre de forma tardia, além de não afetar populações de artrópodes e de inimigos naturais, que são ecologicamente importantes (Alves, 1998). Dentre os agentes microbianos utilizados para o controle de *A. gemmatilis* destacam-se *Baculovirus anticarsia*, *Bacillus thuringiensis*, o qual é facilmente produzido, resistente a variações climáticas, produzindo toxinas durante o processo de esporulação (Simonato *et al.*, 2014) e *Metarhizium rileyi*, o qual é um patógeno cosmopolita e possui uma diversidade genética, causando epizootias em várias espécies de Lepidoptera, incluindo muitas pragas agrícolas importantes da soja e de outras culturas (Alves, 1998; Fronza *et al.*, 2017).

3.2 Sistemas de defesa dos insetos

Os agroquímicos podem possuir em sua composição moléculas com poder oxidante que podem estar relacionadas com a formação de radicais livres (Luz *et al.*, 2003; Franco *et*

al., 2009; Limon-Pacheco & Gonsebatt, 2009). Estes originam espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), que são moléculas altamente instáveis que reagem com as estruturas celulares modificando a estrutura de lipídios e proteínas de membrana, alterando a permeabilidade da membrana celular (Andrade Jr. *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2007; Pereira & Pereira, 2011). Estas alterações podem chegar ao núcleo celular e atingir o DNA acarretando lesões no seu desenvolvimento, quebras na molécula, que podem desencadear graves doenças, inclusive carcinogênese (Ferreira & Matsubara, 1997; Ojha & Srivastava, 2014; INCA, 2017. Se a lesão se fixar, podem ocorrer mutações que se perpetuam nas células filhas durante a replicação (White & Rasmussen, 1998; Obe *et al.*, 2004; Bortoli *et al.*, 2009).

Com a finalidade de evitar ou minimizar esses efeitos, o sistema de defesa antioxidante, que é composto por um conjunto de enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutatina-S-transferase (GST), tioredoxina redutase (Trxr) aumenta suas atividades. Porém, na maioria das situações os agroquímicos como o glifosato ocasionam desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema antioxidante, induzindo ao estresse oxidativo (Sies, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2007; Monserrat *et al.*, 2007).

Estudos relatam que o glifosato pode alterar os sistemas de defesa antioxidante, bem como induzir EROs e dano oxidativo em ostras (Mottier *et al.*, 2015), no verme *Lumbriculus variegatus* (Contardo-Jara *et al.*, 2009), aranhas (Benamú *et al.*, 2010), em ratos (Larsen *et al.*, 2012) e várias espécies de peixes (Gluszcak *et al.*, 2007; Modesto & Martinez, 2010, Sinhorin *et al.*, 2014). Não há muitos estudos que evidenciem a ação de glifosato sobre insetos, porém, Schneider *et al.* (2009) constataram uma redução na fertilidade e fecundidade, além de desenvolvimento de tumor abdominal em insetos da ordem Neuroptera. Em Diptera, foi relatado que o glifosato causa efeitos de genotoxicidade em *Drosophila melanogaster*

(Kaya *et al.*, 2000), embora o mecanismo não tenha sido determinado, além de alterações imunológicas e bioquímicas (Glusczak *et al.*, 2006; Achiorno *et al.*, 2008).

Segundo a literatura, foi observada mortalidade significativa em anfíbios (Relyea, 2005), no peixe *Prochilodus lineatus* (Langiano & Martinez, 2008) e em moscas *D. melanogaster* (De Aguiar *et al.*, 2016) quando expostos ao herbicida glifosato.

Além da morte e da redução da fecundidade, os agroquímicos podem causar múltiplos efeitos secundários, tais como redução no ciclo de vida, mutações na prole, perda de peso e mudanças nas taxas de fertilidade, alterações no comportamento da oviposição e tempos de desenvolvimento como observado em *Chrysoperla externa* (Schneider *et al.*, 2009).

A constatação da genotoxicidade dos agrotóxicos é fundamental para verificar o risco genético não somente aos seres humanos expostos, mas a toda a biota. A partir disso, é possível avaliar como ocorrem os efeitos hereditários deletérios, ou mesmo letais, para os organismos (Dallegrave, 2006).

Os insetos sintetizam a enzima quitina sintase (CHS) que participa da formação da quitina em si, com duas classes: CHSA (CHS1) sintetiza quitina para os tecidos epidermais, enquanto CHSB (CHS2) é responsável pela síntese de quitina para o epitélio intestinal (Tellam *et al.*, 2000; Zimoch & Merzendorfer, 2002; Merzendorfer & Zimoch, 2003; Moussian *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

Os polímeros de quitina formam microfibrilas interligadas por pontes de hidrogênio, sendo este biopolímero um dos principais componentes da cutícula dos insetos (Merzendorfer & Zimoch, 2003). A quitina também está presente no intestino anterior e posterior, nos tubos traqueais, em partes do sistema reprodutor (Andersen, 1979; Reynolds & Samuels, 1996; Tunaz & Uygün, 2004) e na cutícula cerosa dos ovos dos insetos (Rezende *et al.*, 2008), além da membrana peritrófica que funciona como uma “cápsula”, participando do processo digestivo e também da proteção do epitélio contra danos mecânicos, toxinas e patógenos

ingeridos junto com o alimento (Lehane, 1997). Visto o indispensável papel da quitina nos insetos, compreende-se porque esta é de interesse para ação de agroquímicos (Ferreira, 2009).

O Rimon SUPRA[®] que possui como princípio ativo o novaluron é inibidor da síntese da quitina (EPA, 2001). Novaluron é eficaz para insetos da ordem Lepidoptera, em especial *A. gemmatalis* (EPA, 2013). É muito indicado por ser pouco tóxico aos mamíferos, e atóxico para aves, vermes do solo e microflora (WHO, 2003; WHO, 2011). Porém, seu mecanismo molecular de ação ainda não é bem conhecido (Cohen, 2001; EPA, 2013).

Os inseticidas reguladores de crescimento (IGRs) como o novaluron podem causar alterações na reprodução, como verificado por Silva & Mendes (2002) em pupas de *Haematobia irritans*. Arias & Mulla (1975) também observaram alterações reprodutivas em *Culex tarsalis* expostos estes inseticidas.

A Organização Mundial da Saúde (WHO) publicou no ano de 2011, relatório referente ao ano de 2005 sobre estudos de resíduos de pesticidas em roedores e bactérias concluindo que novaluron não é genotóxico e pouco provável que possa ser cancerígeno a humanos, estes estudos foram conduzidos pela Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a pela WHO (WHO, 2011).

Ensaio de mutagenicidade e genotoxicidade têm apresentado resultados negativos para glifosato (ANVISA, 2005). Porém, Lioi *et al.* (1998) constataram atividade citotóxica e estímulo da atividade da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase em cultura de linfócitos bovinos, dessa forma propõem que o glifosato causa efeito mutagênico nesta espécie. Hietanen *et al.* (1983) e Peluso *et al.* (1998) constataram a indução da formação de adutos de DNA no rim e fígado de camundongos. Em humanos expostos (n = 24) que vivem no norte do Equador em áreas pulverizadas com uma formulação à base de glifosato constatou-se um aumento estatisticamente significativo de danos no DNA (rupturas dos filamentos de DNA)

em células sanguíneas amostradas duas semanas a dois meses após a pulverização (Paz-y-Miño *et al.*, 2007).

Em estudos *in vitro* testando glifosato foi possível observar quebras de DNA em células do fígado Hep-2 (Mañas *et al.*, 2009), em linfócitos (Mladinic *et al.*, 2009; Alvarez-Moya *et al.*, 2014), fibroblastos de GM38, e na linha de carcinoma bucal TR146 (Koller *et al.*, 2012).

O relatório elaborado em 2016 pelo IARC sobre glifosato e suas formulações, além de estudos *in vivo* com diversas espécies de roedores e *in vitro* com inúmeras variedades de células, possui ainda estudos com invertebrados como minhocas, mexilhões, ostras, caracol e insetos, com diversas espécies de peixes, répteis como crocodilos, e anfíbios como a rã, na qual evidenciam as lesões de DNA causadas nestas espécies quando expostas a este agroquímico.

Dentre os fungos, alguns produzem metabólitos secundários, que são capazes de inibir o crescimento, causar doenças e provocar a morte de diversos organismos. Por exemplo, as destruxinas podem inibir a síntese de proteínas e nucleotídeos e conseqüentemente a síntese de DNA e RNA, mesmo em baixas doses (Odier *et al.*, 1992).

Estudos apontam que *M. rileyi* produz esses metabólitos sobre insetos como larvas de *Bombyx mori* (Ye *et al.*, 1993). Porém, testes de genotoxicidade sobre linhagens de *Salmonella thiphymurium* apontam que o oligopeptídeo NRtox produzido por *M. rileyi* não induz mutações de substituições de pares de base e *frameshift*, indicando ausência de mutagenicidade (Onofre *et al.*, 2004).

Em relação ao sistema imune dos insetos, a cutícula e o exoesqueleto possuem componentes antimicrobianos que impedem a penetração de bactérias, vírus e protozoários na hemocele, constituindo assim, a primeira linha de defesa contra patógenos e parasitóides (Bulet *et al.*, 1999). Internamente, o sistema traqueal e a membrana que recobre as células

epiteliais do tubo digestivo, também representam um mecanismo de defesa aos patógenos que porventura atinjam o intestino dos insetos por via oral (Silva, 2002; Christophides *et al.*, 2004; Hillyer, 2016), sendo essas as barreiras físicas (Liu *et al.*, 2017).

Uma vez que os agentes invasores conseguem ultrapassar o tegumento e o trato digestivo, tornam-se expostos a uma variedade de mecanismos celulares e humorais interagindo na defesa do hospedeiro (Russo *et al.* 2001; Lavine & Strand 2002; Schmid-Hempel 2005).

Assim como nos vertebrados, os insetos apresentam a defesa imunológica subdividida em dois componentes: um componente humoral e outro celular. A resposta humoral é responsável pela realização dos processos de coagulação da hemolinfa (fluido aquoso que contém íons, moléculas e células) (Gullan & Cranston, 2007), melanização que ocorre quando os agentes patogênicos são numerosos ou muito grandes para fagocitar, a qual desencadeia uma cascata proteolítica que leva à produção de fenoxidase (PO) a partir de profenoxidase (PPO) (Jiang *et al.*, 2010; Tanaka & Yamakawa, 2011) e produção de peptídeos antimicrobianos (Vilmos & Kurucz, 1998; Niere *et al.*, 1999; Lavine & Strand, 2002). A produção de espécies de reativas de oxigênio (EROs) nos hemócitos e no intestino médio também é uma parte importante da imunidade inata (Buchon *et al.*, 2014; Kim e Lee, 2014; Lee *et al.*, 2015).

A reação celular é mediada pelos hemócitos, sendo que os mais comuns são plasmócitos, granulócitos, oenócitos, esferulócitos e prohemócitos. Estes possuem funções básicas como a fagocitose, armazenagem e distribuição de nutrientes, encapsulamento e formação de nódulos (Gonzalez *et al.*, 2013; Strand, 2008). Estas células variam muito em forma, função e em número – de aproximadamente 1.000 a 100.000 por mm^3 , mas correspondem em média cerca de 50.000 por mm^3 . Algumas circulam na hemolinfa e outras aderem à superfície dos tecidos. As funções dos diversos tipos de hemócitos não são bem

conhecidas e a hemolinfa de diversos insetos difere na capacidade de coagulação (Triplehorn & Johnson, 2011).

Os hemócitos de lepidópteros foram descritos por Gupta, (1979, 1991) e Brehélin & Zachary (1986). Os prohemócitos são as menores células encontradas, (arredondadas com superfície regular), consideradas como células-tronco de hemócitos, possuindo alta taxa mitótica podendo também dividir-se quando livres na hemolinfa, sendo precursoras de plasmócitos e granulócitos.

Plasmócitos são geralmente alongados ou fusiformes, com superfície irregular, apresentando micropapilas, filopódios ou outros processos celulares. O núcleo é pleomórfico, podendo apresentar-se bilobado, o citoplasma é abundante, rico em organelas. Em contato com uma superfície, estas células expandem o citoplasma e aderem à mesma. São células sabidamente envolvidas em processos como fagocitose, encapsulação e nodulação (Gupta, 1979, 1991; Brehélin & Zachary, 1986).

Granulócitos são arredondados a ovais, tendo a superfície coberta por finas projeções citoplasmáticas. Apresentam grânulos característicos, cujas proporções e aspecto são variáveis, com relatos de que sua constituição seja glicoproteica. Estas células apresentam atividade fagocítica e estão envolvidas na encapsulação (Gupta, 1979, 1991; Brehélin & Zachary, 1986).

Esferulócitos são células grandes, caracterizadas por possuírem o citoplasma praticamente tomado por grandes esférulas, as quais apresentam conteúdo granular. A extrusão deste conteúdo na hemolinfa se dá por exocitose. O núcleo é central e pequeno com relação ao tamanho da célula, foram ainda relatados como fonte de PPO (Sass *et al.*, 1994), sendo que essa pode apresentar quantidades semelhantes ou mesmo maiores do que a PPO produzida por oenócitos, uma vez que os esferulócitos são mais abundantes na hemolinfa de *A.gemmatalis* (Silveira *et al.*, 2003).

Oenócitos são as maiores células, arredondadas, de superfície lisa, e baixa proporção núcleo/citoplasma. O citoplasma é caracterizado pela pobreza em organelas membranosas, o que lhes confere um aspecto homogêneo. Apresentam atividade de fenoxidase quando incubados com tirosina, dihidroxifenilalanina (DOPA) ou dopamina. Estas células apresentam comportamento lábil, com rompimento da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular (Gupta, 1979, 1991; Brehélin & Zachary, 1986).

Os adipohemócitos são células que acumulam grânulos densos contendo lipídio durante o desenvolvimento larval, que lhe fornece energia (Butt e Shields, 1996). Essas células são muito semelhantes aos granulócitos o que pode dificultar a visualização e muitas vezes são descritas apenas como granulócitos (Yamashita & Iwabuchi, 2001).

A ativação das respostas imunes humorais e celulares depende do reconhecimento de agentes patogênicos, que é mediado através de uma interação específica entre padrões de reconhecimento de receptores (PRRs) derivados do hospedeiro e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) na superfície dos micro-organismos (Hillyer, 2016; Hughes, 2012). Atualmente, vários PRRs foram identificados, assim como suas funções na regulação da imunidade inata dos insetos, sendo na maioria proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs), proteínas de ligação Gram-negativas (GNBPs), lectinas de tipo C, proteínas contendo tioéster, proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs), galectinas e proteínas do domínio da imunoglobulina (Palmer & Jiggins, 2015; Zhang & Lu., 2015).

Existem duas vias elucidadas de sinalização humoral que produzem peptídeos antimicrobianos em *D. melanogaster* e outros insetos: a via Toll e a via de imunodeficiência (Imd) (Wang & Ligoxygakis, 2006; Lemaitre & Hoffmann, 2007). A via de Toll é ativada principalmente por bactérias gram-positivas e fungos, onde ocorre a ativação de drosomycin e outros peptídeos, e a via de Imd é ativada principalmente por bactérias gram-negativas (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Buchon *et al.*, 2014). Nas duas vias, os peptídeos

antimicrobianos são produzidos e liberados para a hemolinfa, onde matam as bactérias invasoras e os fungos (Hoffmann, 2003; Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Com a invasão de agentes patogênicos, o número de hemócitos pode variar, porém, o mecanismo para isso não está bem descrito (Strand, 2008). Após o patógeno ser detectado, parte da imunidade humoral é ativada, a PPO se liga a este através de proteínas e induz a melanização na hemolinfa a fim de eliminá-lo (Ashida & Brey, 1998; Kanost *et al.*, 2016 Lu *et al.*, 2014). Quando o agente patogênico é grande ocorre o encapsulamento em torno desse, ocorrendo assim a ativação da imunidade celular e após a indução da melanização (Strand, 2008).

O estudo dos hemócitos é importante para a compreensão das interações entre o hospedeiro e o patógeno, pois o conhecimento das respostas imunológicas que estão presentes na hemolinfa dos insetos pode fornecer informações valiosas para o delineamento de novas formas de controle biológico (Silva, 2002), uma vez que este ocorre quando o patógeno consegue vencer com sucesso o sistema de defesa do hospedeiro (Falleiros *et al.*, 2003). Após o patógeno vencer as barreiras e atingir a hemocele do inseto, este desencadeia a defesa hemocitária, que seria a resposta imunológica (Bulet *et al.*, 1999).

Metarhizium rileyi infecta a lagarta de duas formas: via tegumento e oral. Quando o fungo alcança a hemocele, ocorre produção de micotoxinas, bloqueio mecânico do aparelho digestivo, desta forma os tubos germinativos crescem e produzem corpos hifais (blastósporos), esses não sendo reconhecidos pelo sistema imune replicam intensamente na hemolinfa. No final do ciclo de infecção, a massa de hifas germina para formar o micélio emergindo do cadáver mumificado (Lopez-Lastra & Boucias, 1994; Alves, 1998; Wang & St Leger, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Lagartas

As lagartas *Anticarsia gemmatalis* utilizadas neste estudo foram provenientes da criação em dieta artificial (Greene *et al.*, 1976) mantida no Laboratório de Controle de Pragas a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ e umidade relativa de $75\% \pm 1$.

4.2 Inseticida Químico

O inseticida químico usado nos experimentos foi o Rimon SUPRA[®], produto comercial à base de novaluron registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sob número 14511, sendo a titular do registro a empresa Adama Brasil. (AGROFIT, 2015). Possui na composição 100g/L de novaluron e 1020g/L de ingredientes inertes. Tem classificação toxicológica III – medianamente tóxico e classe II – muito perigoso ao meio ambiente.

4.3 Herbicida

O herbicida utilizado nos ensaios foi o Roundup WG[®], produto comercial à base de glifosato, fabricado pela empresa Monsanto e registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sob número 2094 (AGROFIT, 2015). Possui como ingrediente ativo Sal de Amônio de Glifosato 792,5 g/kg (720 g/kg equivalente de N-(fosfometil) glicina (Glifosato) e 207,5 g/kg de ingredientes inertes. Tem classificação toxicológica III – medianamente tóxico e classe III – perigoso ao meio ambiente.

4.4 Fungo Entomopatogênico

A linhagem do fungo *M. rileyi* utilizada foi a Sa86101 (isolada de *A. gemmatalis* coletadas em Sarandi/RS) mantida na coleção do Laboratório de Controle de Pragas – UCS.

4.5 Avaliação dos efeitos do fungo *Metarhizium rileyi* e agroquímicos sobre *Anticarsia gemmatalis*

Esta avaliação foi realizada por meio de bioensaios utilizando lagartas de *A. gemmatalis* com os diferentes agentes de controle. O herbicida glifosato na concentração 25% (12,5µg/100ml) e 12,5% (6,25µg/100ml) e o inseticida novaluron na concentração 25% (12,5µL/100ml) e 12,5% (6,3µL/100ml) foram diluídos, de forma homogênea na dieta artificial. Os bioensaios com o entomopatógeno *M. rileyi* foram realizados em placas de Petri contendo papel filtro previamente esterilizadas. As suspensões de conídios foram distribuídas sobre o papel filtro nas concentrações de 1.10^7 e 1.10^9 conídios/ml. As placas foram mantidas em estufa incubadora tipo B.O.D. sob temperatura de 26 °C; fotofase de 12h e 65% UR por um período de 24 horas. Após este período, os insetos foram transferidos para dieta artificial e mantidos nas mesmas condições dos demais tratamentos, sendo que cada lagarta foi colocada individualmente em copo plástico de 50mL, juntamente com um chumaço de algodão umedecido e cerca de 1g de dieta artificial. Para os bioensaios com o glifosato e o entomopatógeno, foram utilizadas lagartas de 3º instar e para bioensaios com novaluron lagartas de 5º instar.

4.5.1 Identificação e quantificação dos hemócitos

A identificação e a contagem diferencial dos hemócitos (CDH) foi feita em microscópio segundo metodologia descrita por Kwon *et al.* (2014), diluindo-se a hemolinfa dos insetos na proporção de 2:1 (hemolinfa: solução anticoagulante). Para a contagem total de

hemócitos (CTH) utilizou-se metodologia descrita por De Negreiro *et al.* (2009) com adaptações, sendo a hemolinfa fresca diluída 10 vezes com um tampão anticoagulante (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M EDTA, 0,041 M ácido cítrico) (Mead *et al.*, 1986), homogeneizadas e a contagem dos hemócitos foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer em microscópio óptico.

Os testes foram realizados com 2 repetições (10 lagartas/tratamento). Nos bioensaios com glifosato e com *M. rileyi* as análises foram realizadas no 8º, 10º e 12º dia após início da alimentação e com novaluron no 3º e 5º dia após o início da alimentação. Nestes intervalos determinados foram coletados 3µl da hemolinfa dos insetos por punção abdominal diluindo-se em solução anticoagulante para inseto (Mead *et al.*, 1986).

4.5.2 Avaliação dos parâmetros biológicos

Foram utilizadas 30 lagartas para cada concentração de cada tratamento (novaluron, glifosato e *M. rileyi*) e um grupo controle em cada tratamento, totalizando 270 lagartas de *A. gemmatilis*. As taxas de mortalidade foram avaliadas diariamente assim como a mudança de instar até tornar-se adulto, avaliando-se os efeitos na duração da fase larval e pupal, peso, comprimento e largura da pupa. Os bioensaios foram mantidos em sala climatizada (temperatura de 25 ± 1 °C e UR de $70 \pm 5\%$) (Silva *et al.*, 2007).

Posteriormente foram formados 2 casais provenientes dos ensaios de cada concentração, além do grupo controle com insetos adultos que emergiram no mesmo dia. Os insetos foram mantidos em pares dentro de recipientes cilíndricos de plástico (10 cm de diâmetro e 15 cm de altura) fechados com tecido poroso, ao qual foram anexadas fitas de papel de filtro para a oviposição. A parte inferior do recipiente foi fechada com uma placa de Petri (10,5 cm de diâmetro) revestida com papel de filtro. A alimentação consistiu em dieta líquida (Hoffmann-Campo *et al.*, 1985), fornecida uma vez ao dia e mantida sob refrigeração. Além disso, foi fornecida água destilada para a hidratação dos insetos, em outra placa de Petri com algodão.

Os recipientes foram examinados diariamente para registrar a sobrevivência dos adultos, remover e contar o número de ovos, avaliando-se fecundidade (número de ovos por fêmea) e duração do período de oviposição. Para este fim, cada aglomerado de ovos foi individualizado em uma placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada, onde permaneceram até a eclosão das larvas.

4.5.3 Determinação de marcadores do metabolismo redox

Foram utilizadas trinta lagartas de 3º ínstar de *A. gemmatilis* em cada grupo, que incluíram duas concentrações de glifosato (1,25µg/100ml e 0,625µg/100ml) e um grupo controle. O estresse oxidativo e nitrosativo, bem como as defesas celulares antioxidantes enzimáticas e foram avaliadas no 8º, 10º e 12º dia após o início da alimentação com dieta contendo o agroquímico. As lagartas de cada tratamento foram homogeneizadas (cinco insetos por mL) em tampão de fosfato de potássio 50 mM gelado contendo 0,5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 7,2 e centrifugado a 1,500 x g a 4 ° C durante 5 min. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios.

4.5.3.1 Proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino como padrão.

4.5.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinar o índice de peroxidação lipídica, utilizou-se a avaliação da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação de aquecimento. Esse ensaio é amplamente utilizado por apresentar-se como um método sensível para a medição da

peroxidação lipídica (Wills, 1966). Foram adicionados 1000 μL de ácido tricloroacético (5%) a 250 μL de sobrenadantes e centrifugados a 7000 x g durante 10 minutos. Em seguida, foram misturados 1000 μL de ácido sulfúrico (3 M) com 1000 μL de solução de ácido tiobarbitúrico. A mistura reacional foi incubada em banho-maria durante 15 minutos e arrefecida até a temperatura ambiente. Também foram adicionados 3500 μL de n-butanol e centrifugados a 7000x g durante 5 min. A absorbância foi lida a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol/MDA/mg de proteína.

4.5.3.3 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi determinada espectrofotometricamente medindo a inibição da taxa de formação de adrenocromo autocatalítico a 480 nm em um meio de reação contendo uma concentração final de 1 mmol.L⁻¹ de adrenalina (pH 2,0) e 50 mmol.L⁻¹ de glicina (PH 10.2) (Bannister & Calabrese, 1987), com um pH resultante de 10,0. Esta reação foi realizada a uma temperatura constante de 30 ° C durante 3 min. A atividade enzimática foi expressa como unidades de superóxido dismutase por grama de proteína. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação de adrenocromo em 50%.

4.5.3.4 Atividade enzimática da Catalase (CAT)

O princípio do ensaio baseia-se na determinação da taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio, de acordo com Aebi (1984). Adicionou-se 20 μL da amostra ao tampão de fosfato 2910 μL (pH 7,4), mais 70 μL de H₂O₂ (3 mM recentemente diluído), efetuando-se a leitura em espectrofotômetro a 240 nm. A reação foi conduzida à temperatura constante

(30°C) durante 1 min. A atividade enzimática foi expressa como unidades de catalase por mg de proteína. Uma unidade de catalase decompõe 1 mol de H₂O₂ por minuto a pH 7,4 e 30 ° C.

4.5.3.5 Determinação do Óxido Nítrico

A determinação do óxido nítrico (ON) foi realizada a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS). Uma vez gerado ON, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito ($2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$), que foram medidos pela reação de Griess. A mistura reacional contendo 50 µL de amostra foi homogeneizada com 50 µL do reagente de Griess, gerando um composto de coloração rósea. Após, foi agitado e deixado em repouso por 10 min ao abrigo da luz. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 550 nm. Para quantificação, foi empregada uma curva padrão com solução de nitroprussiato de sódio, e os resultados foram expressos em mmol de nitrito/mg de proteína (Green *et al.*, 1981).

4.6 Avaliação da sensibilidade do fungo entomopatogênico ao glifosato e novaluron

Os testes foram realizados com a linhagem Sa86101 de *M. rileyi* conforme metodologia descrita por Botelho & Monteiro (2011). O glifosato e o novaluron foram utilizados de acordo com as recomendações de seus fabricantes. Foram usadas as doses recomendadas (DR) glifosato e novaluron e as subdosagens 50%, 25% e 12,5% da DR.

4.6.1 Cultivo dos fungos em meio contendo os agroquímicos

O fungo foi inoculado em meio de cultura Sabouraud Maltose Ágar (SMAy) contendo as diferentes concentrações do glifosato e novaluron por meio suspensão contendo 1.10^2 conídios/ml espalhada com alça Drigalski para obtenção de colônias isoladas. O glifosato e o novaluron foram adicionados ao meio de cultura na temperatura entre 45 e 50 °C, para evitar

alterações das propriedades químicas dos produtos avaliados. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa a $27 \pm 0,5$ °C por 15 dias, em ausência de luz. Para o controle foram usadas placas contendo apenas a suspensão do fungo.

4.6.2 Quantificação de colônias, avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Metarhizium rileyi*

A quantificação de colônias foi realizada no 15º dia após a inoculação, em contador de colônias, marcando na parte externa do fundo da placa de Petri. A avaliação do crescimento micelial do fungo foi realizada no 15º dia após a inoculação, medindo-se, em milímetros, dois diâmetros perpendiculares das colônias. Para avaliar a produção de conídios foi coletada, de cada placa de Petri, uma colônia com auxílio de um anel metálico esterilizado de 8 mm de diâmetro, no 15º dia de incubação. Estas amostras foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo solução de Tween-80 (0,1% v/v). Após a remoção dos conídios por vigorosa agitação em um agitador elétrico de tubos, foi realizada a contagem ao microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando diluições da suspensão quando necessário.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade. Em caso de significância, as médias foram comparadas por comparação múltipla de média, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tanto para as variáveis qualitativas como quantitativas foi adotada comparação múltipla de média visto que para a última, foram testadas apenas duas concentrações além do controle, impossibilitando a comparação através de análise de regressão. Para todas as variáveis avaliadas, à exceção de contagem total de hemócitos, crescimento micelial, esporulação e número de colônias, os dados foram transformados por $\sqrt{x} + 0,5$. Para as variáveis índice e tempo de mortalidade, os dados foram apresentados

através de estatística descritiva. Para execução de todas as análises utilizou-se o programa Winstat versão 1.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação e quantificação dos hemócitos

5.1.1 Contagem total de hemócitos

O número total de hemócitos circulantes em um inseto varia com os estágios de desenvolvimento e de acordo com fatores fisiológicos (Sanjayan *et al.*, 1996; Beetz *et al.*, 2008).

Na contagem total de hemócitos (CTH) das lagartas alimentadas com dieta acrescida do inseticida novaluron, houve efeito de concentração (Tabela 1).

Tabela 1. Número total de hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (células/mm³) alimentadas com dieta artificial acrescida do inseticida novaluron.

Concentração (µL/100mL)	3 dias	5 dias
Controle	21.700 a ¹	21.700 a
6,3	12.500 b	4.150 b
12,5	7.450 c	2.600 c
C.V. (%) ²	5,67	7,29

¹ Médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação.

Nas análises tanto aos 3 como aos 5 dias após o início da alimentação das lagartas com dieta contendo o inseticida novaluron, os resultados demonstram que houve diferença significativa entre as concentrações em relação ao controle, assim como entre si. Verificou-se uma ação dose dependente negativa, ou seja, conforme aumenta a concentração diminui a quantidade de hemócitos em ambos os dias testados. A menor quantidade de hemócitos ocorreu na maior concentração no 5º dia (Tabela 1).

A diminuição acentuada no número total de hemócitos circulantes pode indicar a infiltração de hemócitos nos tecidos afetados, a baixa reposição das células pelos tecidos hematopoiéticos ou ainda, a ineficiência do sistema imune, ocorrendo assim a morte celular por apoptose e consequentemente a mortalidade das lagartas (Costa & Martins 2009). Essa redução na CTH também foi observada em lagartas de *Agrotis ipsilon* tratadas com o

inseticida dimilin quando comparadas ao controle (El-Aziz & Awad, 2010), assim como em *Spodoptera litura* tratadas com Neem gold (Sharma *et al.*, 2003), e *Mythimna separata* expostas a doses subletais de hexaflumuron, que é um inseticida regulador de crescimento assim como novaluron (Huang *et al.*, 2016).

Na análise realizada no 8º dia tanto o grupo das lagartas que ingeriram dieta contendo o herbicida glifosato, como o grupo das que foram expostas ao fungo *M. rileyi*, demonstraram apenas efeito de concentração. No 10º e 12º dia verificou-se interação entre os fatores (concentração e produto) (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de hemócitos de *Anticarsia gemmatilis* (células/mm³) em ensaios com o fungo e com o herbicida no 8º, 10º e 12º dia.

Produto	Concentração	8º dia	10º dia	12º dia
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	22.700a ¹	22.100a A ¹	22.642a A
	10 ⁷	17.000b	12.400b B	6.500b B
	10 ⁹	13.950c	6.000c B	NA
Glifosato (µg/100mL)	Controle	22.400a	22.200a A	22.850a A
	6,25	16.350b	16.300b A	16.700b A
	12,5	13.563c	12.850c A	14.050c A
C.V. (%) ²		8,19	18,06	4,08

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação; NA: Não avaliado

Evidencia-se que no 8º dia, para ambos os produtos houve diferença significativa entre as duas concentrações, da mesma forma que em comparação com o controle, com redução do número de hemócitos total à medida que aumenta a concentração do fungo ou herbicida (Tabela 2).

A CTH no 10º dia, tanto nos testes com *M. rileyi* como com glifosato apontou diferença estatística em relação ao controle e entre as concentrações. Na comparação entre produtos, a maior quantidade de hemócitos ocorreu nos ensaios com o glifosato seguido do fungo. O mesmo comportamento foi evidenciado no 12º dia de análise, tanto na comparação entre as concentrações como entre produtos, porém, não foi possível quantificar os hemócitos

na maior concentração do fungo visto que havia ocorrido 100% de mortalidade das lagartas (Tabela 2).

Na literatura não há relatos de estudos referentes à análises de hemócitos de insetos expostos ao herbicida glifosato.

Os resultados encontrados para CTH com o herbicida glifosato foram semelhantes ao estudo de Hong *et al.*, (2017), com o mesmo herbicida testado em caranguejo *Eriocheir sinensis*, verificando-se que os hemócitos diminuem em quantidade inicialmente, porém, tornam a aumentar em seguida, sendo que no estudo citado igualam-se novamente ao controle.

No presente estudo observou-se um aumento estatisticamente significativo em relação ao controle. O mesmo foi observado em outras espécies tais como nos mexilhões do mediterrâneo *Mytilus galloprovincialis*, quando expostos ao glifosato, onde nos dois primeiros dias a CTH reduz significativamente, provavelmente em consequência do aumento da migração dos hemócitos circulantes da hemolinfa para os tecidos periféricos com o objetivo de neutralizar processos inflamatórios (Pipe & Coles, 1995; Parry & Pipe, 2004). O aumento dos hemócitos em seguida sugere reversibilidade dos efeitos negativos iniciais de baixas doses de glifosato, e uma capacidade de mexilhões para restaurar ao menos de forma parcial a redução inicial dos hemócitos circulantes. Isso foi provavelmente devido a um aumento da mobilização de hemócitos de tecidos periféricos para a hemolinfa ou um aumento de proliferação de hemócitos (Matozzo *et al.*, 2018). Acredita-se que tenha acontecido o mesmo mecanismo para *A. gemmatalis*.

Em peixes (*Rhamdia quelen*) o glifosato também ocasionou redução significativa do número de hemócitos circulantes (Kreutz *et al.*, 2011), já a exposição durante 7 dias do caracol *Biomphalaria alexandrina* à 10 mg/L do mesmo herbicida causou aumento significativo nos valores de CTH (Mohamed, 2011).

Com base nos resultados do presente estudo e sua relação com a literatura podemos concluir que os efeitos de herbicidas na CTH dependem do ingrediente ativo e da espécie testada, além do planejamento experimental, por exemplo, além do tempo de exposição.

Não há estudos que relatem a quantificação de hemócitos com *M. rileyi*, porém um trabalho com *Agrotis ipsilon* exposta a *Bacillus thuringiensis* que é uma bactéria utilizada para controle biológico, demonstra uma diminuição acentuada na CTH, quando o inseto foi exposto ao entomopatógeno (El- Aziz & Awad, 2010). Resultados similares foram reportados por Ericsson *et al.* (2009) que estudaram a resposta imune à *B. thuringiensis kurstaki* (Btk) em *Trichoplusia* susceptível (Bt-RS) e resistente (Bt-R) após exposição a baixas doses de Btk. Os autores relataram uma redução na contagem de hemócitos após exposição à Btk.

Yaroslavtseva *et al.* (2017) observaram uma diminuição significativa na CTH de larvas do besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*) infectadas por Bt. Resultado semelhante foi visto por Broderic *et al.* (2010) em larvas de *Lymantria dispar*, e por Orozco-Flores *et al.*, (2017) na traça-indiana-da-farinha (*Plodia interpunctella*). Por outro lado, os resultados obtidos no presente estudo, diferem dos detectados por De Azambuja *et al.* (1991) os quais verificaram que a inoculação de *Enterobacter cloacae* causou um aumento imediato e acentuado no CTH em *Rhodnius prolixus* até o 7º dia, seguido por um declínio de CTH após esse período. Além disso, Horohov e Dunn (1982) registraram um aumento acentuado na CTH em larvas de *Manduca sexta* injetadas com bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1.2 Contagem diferencial de hemócitos

Na hemolinfa de *A.gemmatalis* foram identificados seis tipos de hemócitos: oenócitos (OEs) (Figura 1a); prohemócitos (PRs) (Figura 1b), plasmatócitos (PLs) (Figura 1c), granulócitos (GR) (Figura 2a), esferulócitos (ESs) (Figura 2b), adipohemócitos (ADs) (Figura 2c). Os GRs foram os hemócitos mais abundantes seguidos por ESs e PLs. Os ADs foram

numericamente menos abundantes. Essas células seguiram o mesmo padrão morfológico observado por outros autores para a Ordem Lepidoptera (Gupta 1979; Falleiros *et al.*, 2003; Nardi 2004; Negreiro *et al.*, 2004).

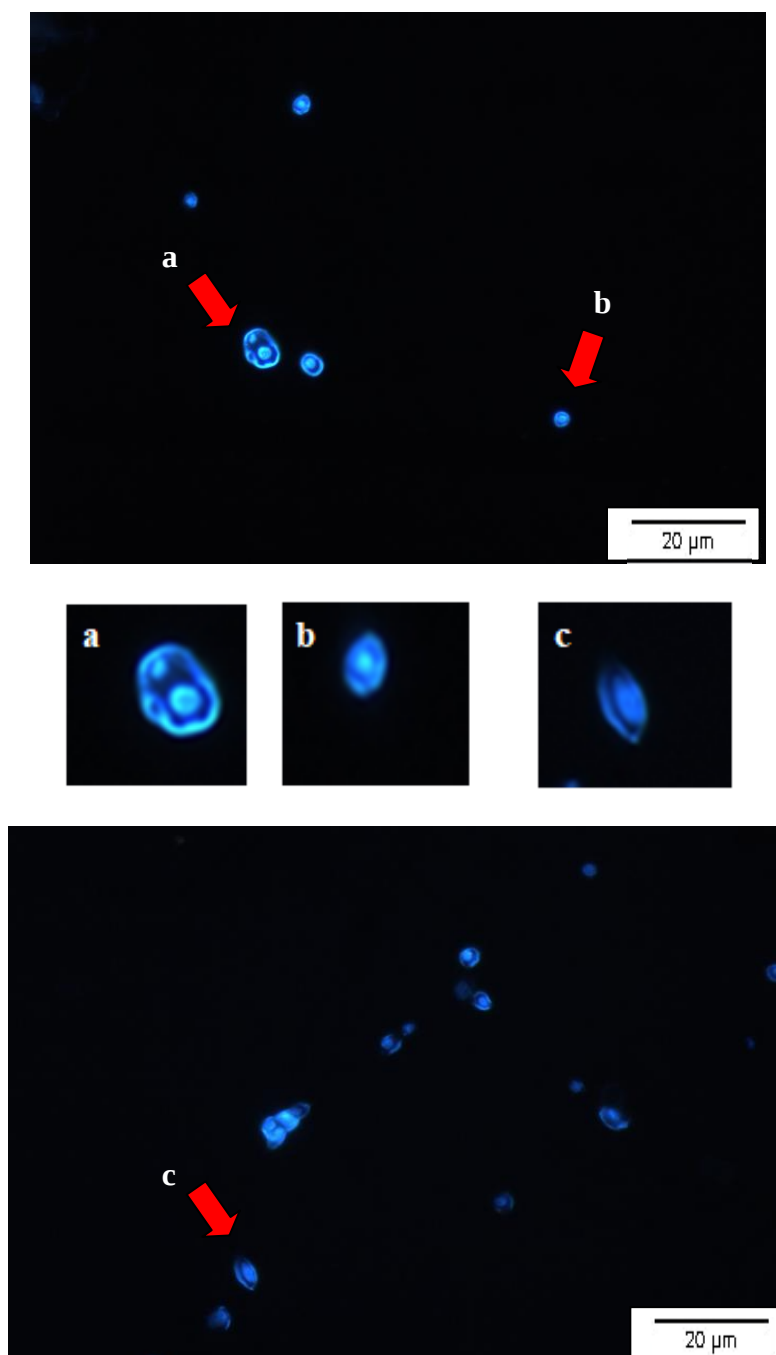


Figura 1. Tipos de hemócitos em *Anticarsia gemmatalis*: a. Oenócito; b. Prohemócito; c. Plasmócito. Barra de escala = 20 μm. Lâmina 4B do grupo controle do glifosato concentração 6,25μg/100mL.

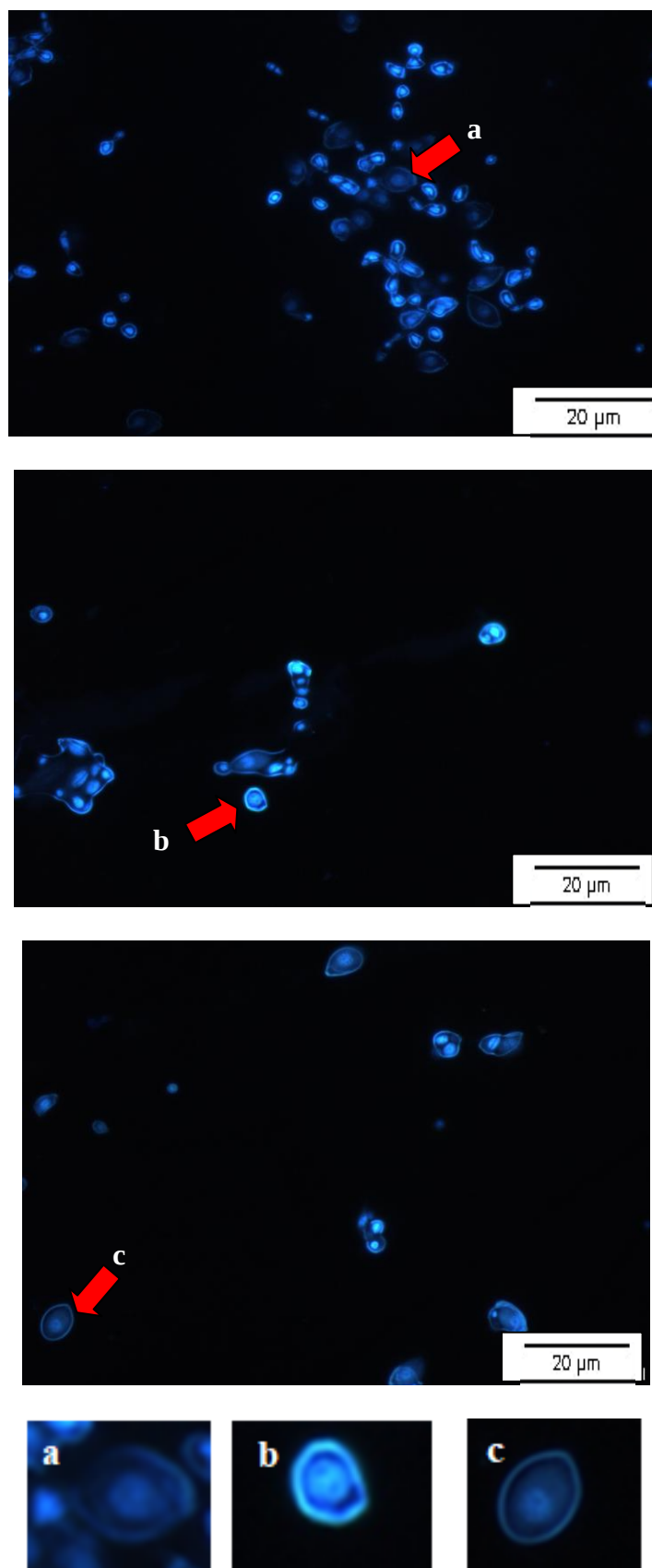


Figura 2. Tipos de hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com dieta artificial do grupo controle: a. Granulócito; b. Esferulócito; c. Adipohemócito. Barra de escala = 20 µm. Lâmina 4B do grupo controle do glifosato concentração 6,25µg/100mL.

Para a contagem diferencial de hemócitos (CDH) das lagartas que ingeriram dieta contendo o inseticida novaluron, tanto no 3º, quanto no 5º dia após o início da alimentação, ocorreu efeito de concentração (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Número de plasmócitos, prohemócitos e oenócitos de *Anticarsia gemmatilis*, avaliados aos 3 e 5 dias após exposição à dietas contendo novaluron em diferentes concentrações.

3 dias			
Concentração (µL/100mL)	Plasmócitos	Prohemócitos	Oenócitos
Controle	15,17 b ¹	3,35 b	5,46 a
6,3	24,99 a	5,02 a	4,31 a
12,5	9,20 c	4,55 ab	2,15 b
C.V. (%) ²	17,50	16,48	11,78
5 dias			
Concentração (µL/100mL)	Plasmócitos	Prohemócitos	Oenócitos
Controle	15,17 a ¹	3,35 a	5,46 a
6,3	15,00 a	2,30 a	4,15 a
12,5	5,65 b	0,60 b	1,00 b
C.V. (%) ²	30,28	19,73	19,08

¹ Médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação.

No 3º dia após o início do bioensaio foi possível observar uma diferença significativa no número de plasmócitos, tanto entre as concentrações como em relação ao controle, sendo que a maior quantidade destas células ocorreu na menor concentração, seguida do controle e por último na maior concentração; na análise de plasmócitos no 5º dia a concentração maior apresentou diferença significativa em relação ao controle e à menor concentração.

O número de prohemócitos no 3º dia apresentou diferença significativa entre o controle e a menor concentração do produto, enquanto a maior concentração não diferiu das demais; no 5º dia ocorreu diferença significativa da maior concentração em relação ao controle e a menor concentração.

Na análise dos oenócitos, tanto no 3º como no 5º dia, a maior concentração apresentou diferença da menor e do controle.

Tabela 4. Número de esferulócitos, adipohemócitos e granulócitos de *Anticarsia gemmatalis*, avaliados aos 3 e 5 dias após exposição à dietas contendo novaluron em diferentes concentrações.

3 dias			
Concentração (µL/100mL)	Esferulócitos	Adipohemócitos	Granulócitos
Controle	31,17 a ¹	3,40 a	37,39 ^{ns}
6,3	21,48 b	2,11 b	42,09
12,5	11,00 c	1,10 c	42,20
C.V. (%) ²	13,33	17,11	20,97
5 dias			
Concentração (µL/100mL)	Esferulócitos	Adipohemócitos	Granulócitos
Controle	31,17 a ¹	3,40 a	37,39 ab
6,3	18,65 b	2,65 a	57,15 a
12,5	4,80 c	0,30 b	27,65 b
C.V. (%) ²	19,73	17,29	35,31

¹ Médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ^{ns}= não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação.

No 3º e no 5º dia houve diferença significativa quanto ao número de esferulócitos em relação ao controle e entre as concentrações, sendo que as quantidades foram dose-dependentes, à medida que aumenta a concentração do produto diminui a quantidade destas células. O mesmo efeito ocorreu com os adipohemócitos no 3º dia; já no 5º dia a maior concentração diferiu do controle e da menor. Em relação aos granulócitos não observou-se diferença significativa entre as concentrações no 3º dia; no 5º dia ambas as concentrações não demonstraram diferença significativa quando comparadas ao controle, apenas entre si, onde a maior quantidade destas células foi verificada na menor concentração (Tabela 4).

Os resultados obtidos no 5º dia corroboram com os obtidos por El-Aziz & Awad (2010), os quais verificaram que os PRs diminuem significativamente em *A.ipsilon* tratadas com o inseticida dimilin, assim como Sharma *et al.*, (2008) observaram em *S. litura* tratada com o óleo essencial de *Acorus calamus*.

A diminuição de PLs e aumento de GRs (exceto na maior concentração do 5º dia) está de acordo com os observados por El-Aziz & Awad (2010) em *A.ipsilon* e por Sharma *et al.*, (2008), em *S. litura* tratada com o óleo essencial de *A. calamus*. Um aumento de GRs

também está de acordo com resultados obtidos por Perveen & Ahmad (2017) na avaliação de *Apis dorsata* com o etofenprox e bifentrina.

Os dados referentes à ESs e ADs diferem dos observados por El-Aziz & Awad (2010) em *A. ipsilon* e por Peter & Ananthakrishnan (1995) em *Cyrtacanthacris tatarica* tratada com azadiractina, na qual observaram um aumento dessas células. Perveen & Ahmad (2017) também observaram diminuição em ESs de *A. dorsata* com bifentrina e endosulfan. Ayaad *et al.* (2001) evidenciaram uma diminuição de PLs de *Parasarcophaga surcoufi* exposta a azadiractina.

Na primeira avaliação dos hemócitos (prohemócitos, plasmócitos e oenócitos) realizada no 3º dia após o início da alimentação das lagartas com o inseticida foi possível constatar que ocorrem mudanças no sistema imune, como também observado por outros autores (Lavine & Strand, 2002; Manachini *et al.*, 2011), sendo que na menor concentração ocorreu um processo de reconhecimento e tentativa de defesa, através do aumento de plasmócitos e de granulócitos, os quais possuem função de encapsulação na maioria dos lepidópteros. Os prohemócitos, que são as células tronco, diminuem evidenciando que já foram diferenciados em outras células de defesa. Ocorre também diminuição no número de adipohemócitos.

Em todas as análises observou-se redução significativa dos esferulócitos, sendo que estas células realizam a liberação de PPO e melanização nos lepidópteros, além de estarem relacionadas à renovação tecidual, transporte de substâncias como hormônios e produção de algumas proteínas (Gonçalves, 1983; Ratcliffe *et al.*, 1985). Desta forma, apesar da tentativa de defesa, é possível evidenciar que o agente é tóxico para a lagarta, visto que o sistema imune entra em declínio à exceção dos granulócitos que se empenham em encapsular o agente patogênico.

Esse declínio do sistema imune fica evidente na avaliação dos hemócitos no 10º dia, em que ocorre redução de todas as células, com exceção dos granulócitos na menor concentração, indicando que o sistema imune está em colapso e a lagarta irá a óbito em pouco tempo, resultado este esperado por se tratar de um inseticida.

Considerando-se plasmócitos, esferulócitos e granulócitos (8º, 10º e 12º dia) em bioensaios com *M. rileyi* e com glifosato observou-se interação entre produtos e concentrações (Tabela 5).

Tabela 5. Número de plasmócitos, esferulócitos e granulócitos de *Anticarsia gemmatilis*, avaliados aos 8, 10 e 12 dias em ensaios com o fungo e com o herbicida.

8 dias				
Produto	Concentração	Plasmócitos	Esferulócitos	Granulócitos
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	18,00 b A ¹	34,20 a A	35,60 b A
	10 ⁷	25,36 a A	21,20 b A	41,90 b A
	10 ⁹	30,25 a A	5,30 c B	56,90 a A
Glifosato (µg/100mL)	Controle	17,50 a A	31,80 a A	36,70 a A
	6,25	24,37 a A	19,17 b A	44,27 a A
	12,5	22,11 a B	19,07 b A	39,88 a B
C.V. (%) ²		12,81	14,80	12,76
10 dias				
Produto	Concentração	Plasmócitos	Esferulócitos	Granulócitos
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	-	32,00 a A	-
	10 ⁷	-	29,07 a A	-
	10 ⁹	-	0,70 b B	-
Glifosato (µg/100mL)	Controle	-	31,50 a A	-
	6,25	-	37,40 a A	-
	12,5	-	29,75 a A	-
C.V. (%) ²		-	22,18	-
12 dias				
Produto	Concentração	Plasmócitos	Esferulócitos	Granulócitos
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	18,80 a A ¹	32,00 a A ¹	36,30 a A
	10 ⁷	3,80 b B	22,90 a A	19,40 b B
	10 ⁹	NA	NA	NA
Glifosato (µg/100mL)	Controle	18,00 a A	34,20 a A	35,66 a A
	6,25	14,15 a A	24,41 a A	31,44 a A
	12,5	14,38 a A	26,94 a A	36,66 a A
C.V. (%) ²		22,06	33,41	29,45

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação; NA: Não avaliado

A análise dos hemócitos de lagartas infectadas com *M. rileyi* não foi realizada no 12º dia na maior concentração, pois ocorreu 100% da mortalidade das lagartas nesta data de análise.

Nos bioensaios com *M. rileyi* no 8º dia verificou-se diferença significativa quanto ao número de plasmócitos nas duas concentrações quando comparadas ao controle, mas não entre si; no 10º dia não houve diferença para nenhuma variável; no 12º dia, houve diferença significativa entre a menor concentração e o controle.

Na análise de plasmócitos nos ensaios com glifosato no 8º dia não houve diferença entre as concentrações, nem destas em relação ao controle; no 10º não houve diferença para nenhuma variável; no 12º dia não houve diferença significativa entre as concentrações, nem destas em relação ao controle.

Considerando-se a interação entre produtos no 8º dia, a quantidade de plasmócitos foi semelhante em todas as concentrações, à exceção da concentração maior de glifosato que diferiu das demais; no 12º dia o número de plasmócitos foi semelhante com exceção da menor concentração do fungo onde se verificou redução significativa do número destas células.

Em relação aos esferulócitos nos testes com o fungo *M. rileyi*, no 8º dia verificou-se diferença estatística entre as concentrações e destas em relação ao controle; no 10º dia a maior concentração diferiu do controle e da menor concentração, não sendo observada diferença significativa entre o controle e a menor concentração; em tratamentos com o fungo *M. rileyi*, após 12 dias o número de esferulócitos não diferiu do controle.

Os esferulócitos avaliados nos ensaios com glifosato no 8º dia não apresentaram diferença estatística entre as concentrações, apenas em relação ao controle; no 10º e 12º dia não houve diferença significativa entre as concentrações e nem destas em relação ao controle.

Quando foram comparados os produtos, no 8º dia na maior concentração de fungo observou-se uma redução significativa do número de esferulócitos; no 10º e 12º dia o número

de esferulócitos foi semelhante em todas as concentrações, salvo a menor concentração de *M. rileyi* na qual verificou-se um número bem menor deste hemócito.

Na CDH dos granulócitos nos ensaios com *M. rileyi*, no 8º dia a maior concentração diferiu da menor e do controle; no 10º dia não houve diferença para nenhuma variável e no 12º dia a menor concentração apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Com o herbicida glifosato, no 8º dia houve equivalência no número de granulócitos entre as duas concentrações e em relação ao controle; no 10º e 12º dias não ocorreu diferença estatística entre as concentrações, nem destas em relação ao controle.

Em relação à comparação entre produtos no 8º dia, a quantidade de granulócitos foi semelhante em todas as análises, sendo que a única diferença ocorreu na maior concentração de glifosato; no 12º dia o número de granulócitos se equivaleu, salvo na menor concentração do fungo que demonstrou redução significativa.

Para prohemócitos, oenócitos e adipohemócitos no 8º e 10º dia do bioensaio com *M. rileyi* e glifosato, houve apenas efeito de concentração. No 12º dia houve efeito de concentração e de produto (Tabela 6).

Na contagem de prohemócitos no 8º e no 10º dia apenas a maior concentração do fungo *M. rileyi* apresentou diferença significativa em relação à menor concentração e ao controle; no 12º dia não houve diferença significativa no número de prohemócitos entre a menor concentração e o controle.

Em relação à avaliação de prohemócitos no 8º dia, não houve diferença estatística entre as concentrações de glifosato e nem destas em comparação ao controle; no 10º dia as concentrações diferem do controle, mas não entre si; no 12º dia não ocorreu diferença significativa entre as concentrações, apenas destas em relação ao controle.

Na comparação entre produtos no 10º dia, a maior quantidade de prohemócitos foi observada nos ensaios com o herbicida, tal como no controle do fungo, seguido pelas duas

concentrações de *M. rileyi*, já no 12º dia o número de prohemócitos foi semelhante em ambos produtos, exceto na menor concentração do fungo (Tabela 6).

Tabela 6. Número de prohemócitos, oenócitos e adipohemócitos de *Anticarsia gemmatalis*, avaliados aos 8, 10 e 12 dias em ensaios com o fungo e com o herbicida.

8 dias				
Produto	Concentração	Prohemócitos	Oenócitos	Adipohemócitos
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	3,70 a ¹	5,30 a	3,20 a
	10 ⁷	2,60 a	5,15 a	3,15 a
	10 ⁹	2,05 b	3,00 b	2,40 a
Glifosato (µg/100mL)	Controle	3,50 a	6,80 a	3,90 a
	6,25	3,04 a	4,94 ab	4,31 a
	12,5	2,70 a	3,83 b	2,70 b
C.V. (%) ²		18,97	14,72	14,02
10 dias				
Produto	Concentração	Prohemócitos	Oenócitos	Adipohemócitos
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	2,60 a A ¹	5,80 a A	4,25 a ¹
	10 ⁷	2,10 a B	6,19 a A	3,02 a
	10 ⁹	0,15 b B	0,50 b B	0,30 b
Glifosato (µg/100mL)	Controle	3,40 a A	7,00 a A	4,10 a
	6,25	1,40 b A	5,00 ab A	1,80 b
	12,5	1,60 b A	3,85 b A	0,80 b
C.V. (%) ²		15,92	18,92	23,77
12 dias				
Produto	Concentração	Prohemócitos	Oenócitos	Adipohemócitos
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	2,60 a A	5,80 a A	4,40 a A
	10 ⁷	5,75 a B	1,30 b B	1,70 b B
	10 ⁹	NA	NA	NA
Glifosato (µg/100mL)	Controle	3,70 b A	5,30 a A	3,20 a A
	6,25	12,28 a A	4,23 a A	3,44 a A
	12,5	13,95 a A	4,06 a A	3,80 a A
C.V. (%) ²		31,54	22,00	27,85

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação; NA: Não avaliado.

Nos ensaios para quantificação dos oenócitos, no 8º e no 10º dia a maior concentração de *M. rileyi* demonstrou diferença significativa em relação ao controle e a menor concentração; no 12º houve diferença significativa entre a menor concentração e o controle.

Para oenócitos no 8º e 10º dia, houve diferença entre a maior concentração de glifosato e o controle, enquanto a menor concentração equivaleu-se à maior concentração e ao

controle; no 12º dia não houve diferença significativa entre as concentrações, nem destas em relação ao controle.

Na comparação entre produtos no 10º e 12º dia a quantidade de oenócitos vista em s tratamentos com *M. rileyi* e glifosato foi semelhante, com exceção da maior concentração de *M. rileyi*, na qual observou- se uma quantidade bem inferior desta célula.

No 8º dia não houve diferença estatística no número de adipohemócitos entre as concentrações de *M. rileyi*; no 10º dia a maior concentração diferiu da menor e do controle; no 12º dia ocorreu diferença entre a menor concentração e o controle. Nos ensaios com glifosato no 8º dia constatou- se diferenças no número de adipohemócitos entre as duas concentrações e o controle; no 10º dia as duas concentrações diferiram do controle mas não entre si; no 12º dia não ocorreu diferença significativa.

Na comparação entre produtos (glifosato e fungo) no 12º dia o número de adipohemócitos observado foi semelhante, porém, na menor concentração do fungo ocorre um número inferior dessa célula.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os obtidos por El-Aziz & Awad (2010), os quais verificaram que os PLs e GRs de *A. ipsilon* infectada com *B. thuringiensis*, aumentam no início da infecção, porém em seguida diminuem significativamente e os PRs diminuíram no início do processo infectivo. Em relação aos ESs, os resultados obtidos contrastam, visto que os autores observaram um aumento dessas células e no presente trabalho na menor concentração eles oscilam e na maior concetração reduzem. Resultados semelhantes foram relatados por Horohov & Dunn (1982), os quais observaram que larvas de *M. sexta* infectadas com bactérias apresentam diminuição significativa nas porcentagens de GRs e PLs. Além disso, Chain & Anderson (1982) demonstraram que a infecção por *Bacillus cereus* pode causar uma diminuição de PLs na hemolinfa de *Galleria mellonella*.

Analisando os resultados da CDH dos insetos submetidos à bioensaios com o fungo *M. rileyi* na concentração 1.10^7 con/mL verificou-se que o sistema imune das lagartas é ativado e inicia um processo de defesa constante com o objetivo de eliminar o patógeno, sendo que até a última análise no 12º dia o inseto luta para sobreviver.

Nas análises do 8º e do 10º dia os granulócitos e plasmócitos estão envolvidos na tentativa de encapsulação e nodulação do agente patogênico (Lavine & Strand, 2002), porém, além destas células estarem diminuídas no 12º dia, os esferulócitos responsáveis por melanização e liberação de PPO também estão em declínio, indicando que nos próximos dias, apesar da mobilização do sistema imune através da constante produção e leve aumento de PRs, o inseto não irá mais sobreviver, até mesmo porque os ADs também estão reduzindo. Na concentração 1.10^9 con/mL, apesar do aumento de plasmócitos e dos granulócitos no 8º dia e a manutenção desses no 10º dia para defesa contra o patógeno o sistema imune não suporta o ataque do fungo e as lagartas morrem, não sendo possível a análise no 12º dia.

Nos hemócitos dos insetos que ingeriram a dieta contendo glifosato, foi possível observar um comportamento distinto do sistema imune quando se comparou herbicida e o agente biológico. O número de PLs, GRs e ESs apresentou pequenas oscilações, entretanto nenhuma de forma significativa, o que pode indicar que, apesar do sistema imune ser atingindo, foi possível a sobrevivência do inseto. Observa-se também uma elevação no número de PRs no 10º e 12º dias demonstrando que o sistema hematopoético está liberando mais células novas para diferenciação, além dos ADs estarem discretamente elevadas, apesar do aumento não ser significativo.

A partir dos resultados obtidos, evidencia-se o quão é importante o estudo dos hemócitos para a compreensão das interações entre o hospedeiro e o patógeno, pois o conhecimento das respostas imunológicas que estão presentes na hemolinfa dos insetos pode fornecer informações valiosas para o delineamento de novas formas de controle biológico

(Silva, 2002), uma vez que este ocorre quando o patógeno consegue vencer com sucesso o sistema de defesa do hospedeiro (Falleiros *et al.*, 2003). Após o patógeno vencer as barreiras e atingir a hemocele do inseto, este desencadeia a defesa hemocitária, que seria a resposta imunológica (Bulet *et al.*, 1999), conforme ocorreu na lagarta após ingerir dieta com os produtos testados no presente trabalho.

5.2 Avaliação dos parâmetros biológicos

Em relação aos parâmetros biológicos (duração dos ínstar, fases de pré-pupa, pupa e adulto) e parâmetros morfométricos das pupas (largura, comprimento e peso) verificou-se que houve relação na forma de ação entre produtos e concentrações (Tabelas 7 a 10).

Não foi possível realizar o bioensaio com o inseticida para avaliação dos parâmetros biológicos, devido à mortalidade de 100% dos insetos próximo ao 5º dia.

Na avaliação do dia em que a lagarta atingiu o 4º ínstar após o início do bioensaio, tanto com o herbicida glifosato como com *M. rileyi* não houve diferença estatística entre as concentrações. Nos tratamentos, com o herbicida e com o fungo verificou-se comportamento semelhante. No 5º ínstar não ocorreram diferenças entre as concentrações do herbicida glifosato. Nos testes com o fungo *M. rileyi* houve diferença entre as concentrações, assim como dessas em relação ao controle. Na comparação entre produtos, o tempo para troca de ínstar foi maior nos ensaios com o herbicida glifosato do que nos com o fungo *M. rileyi*. Em relação ao 6º ínstar, considerando o herbicida glifosato não foram constatadas diferenças entre as concentrações e o controle, porém com a utilização do fungo *M. rileyi* verificou-se diferença entre as concentrações e o controle. Comparando produtos no 6º ínstar, evidencia-se comportamento semelhante ao 5º ínstar (Tabela 7).

Tabela 7. Dia em que ocorreu a troca do 4º, 5º e 6º ínstar de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com dieta artificial acrescida de agentes químicos e em contato com o agente biológico.

Produto	Concentração	4º instar	5º instar	6º instar
Glifosato (µg/100mL)	Controle	3,03a A ¹	6,02a A	7,97ab A
	6,25	3,27a A	6,60a A	8,13a A
	12,5	3,17a A	5,63a A	7,20b A
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	3,03a A	6,02a A	7,97a A
	10 ⁷	3,37a A	2,27b B	1,47b B
	10 ⁹	3,33a A	0,83c B	NA
C.V. (%) ²		9,81	20,90	17,41

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação NA: não avaliado

Na avaliação do dia em que as lagartas atingiram a fase de pré-pupa, verificou-se diferença significativa entre a menor e a maior concentração do herbicida glifosato e deste em relação ao controle.

No ensaio com o fungo *M. rileyi* ocorreu diferenças entre a menor concentração e o controle.

Considerando-se o período pupal, verificou-se diferença entre as duas concentrações de glifosato. Nos ensaios com o fungo ocorreu diferença entre a menor concentração e o controle.

Na fase adulta, apenas os insetos provenientes dos ensaios com a maior concentração de glifosato apontaram diferença estatística em relação ao controle e a menor concentração; com o fungo não observou-se diferença estatística entre a concentração menor e o controle. No que se refere à comparação entre produtos, o comportamento foi semelhante em todas as fases (pré-pupa, pupa e adulto), sendo que não houve diferença entre os produtos (Tabela 8).

Tabela 8. Dia que a lagarta *Anticarsia gemmatalis* atingiu a fase de pré-pupa, pupa e adulto, após a exposição ao fungo e dieta contendo glifosato.

Produto	Concentração	Pré pupa	Pupa	Adulto
Glifosato ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Controle	9,40a A	10,30ab A	20a A
	6,25	9,53a A	10,53a A	19ab A
	12,5	8,20b A	9,13b A	17b A
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	9,40a A	10,30a A	20a A
	10^7	7,86b B	8,86b B	20a A
	10^9	NA	NA	NA
C.V. (%) ²		18,61	19,11	29,79

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação. NA: não avaliado

Os resultados encontrados na maior concentração de glifosato corroboram com Scheneider *et al.*, (2009), o qual verificou que o tempo para atingir a fase adulta de *Chrysoperla externa* foi significativamente mais curto quando essas foram tratadas com o herbicida glifosato.

O tempo de vida de *A. gemmatalis* após início da alimentação com o herbicida glifosato em ambas as concentrações, diminuiu significativamente quando comparado ao controle, porém, não houve diferença estatística entre as concentrações. O fungo *M. rileyi* na menor concentração afetou significativamente o tempo de vida das lagartas após o início do teste quando comparado as lagartas do controle. Na comparação entre produtos o maior ciclo de vida visto a partir do início deste teste foi para as lagartas alimentadas com dieta acrescida do herbicida glifosato, na qual foi semelhante ao ciclo de vida das lagartas alimentadas com dieta controle (Tabela 9).

Tabela 9. Tempo necessário para completar o ciclo de *Anticarsia gemmatalis*, após a exposição à dietas contendo diferentes produtos e concentrações.

Produto	Concentração	Tempo de vida após o início do teste (dias)
Glifosato ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Controle	38a A
	6,25	32b A
	12,5	29b A
Novaluron ($\mu\text{L}/100\text{mL}$)	Controle	38a A
	6,3	0b C
	12,5	0b B
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	38a A
	10^7	26a B
	10^9	0c B
C.V. (%) ²		28,56

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação.

A largura e comprimento das pupas provenientes de ensaios com glifosato não apresentaram diferença estatística em relação ao controle e nem entre as concentrações. *M. rileyi* afetou significativamente a largura, comprimento e peso da pupa quando comparadas ao controle. Na comparação entre produtos tanto largura, como comprimento e peso maiores, foram observados nos ensaios com glifosato e no controle dos testes com fungo, e a seguir as da menor concentração do fungo (Tabela 10). Efeitos do glifosato ocasionando redução de peso foram verificados em estudos com minhocas *Eisenia foetida* (Correira *et al.*, 2015).

Tabela 10. Parâmetros morfométricos de pupas de *Anticarsia gemmatalis*, após a exposição ao fungo *Metarhizium rileyi* e alimentadas com dieta contendo glifosato.

Produto	Concentração	Largura (mm)	Comprimento (mm)	Peso (g)
Glifosato ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Controle	5,09a A	15,58a A	0,21ab A ¹
	6,25	4,69a A	15,55a A	0,22a A
	12,5	4,65a A	14,15a A	0,18b A
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	5,09a A	15,58a A	0,21a A
	10^7	1,26b B	3,89b B	0,06b B
	10^9	NA	NA	NA
C.V. (%) ²		20,62	26,43	4,32

¹ Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação. NA: não avaliado

No que se refere ao índice de mortalidade, nos ensaios com o herbicida o maior percentual de mortalidade foi de 23% na maior concentração próximo ao 10º dia; já na menor concentração verificou-se apenas 10% de mortalidade. Com o inseticida novaluron o índice de mortalidade foi de 100% em ambas as concentrações, próximo ao 4º dia (Figura 3). Nos ensaios com o fungo *M. rileyi*, verificou-se 100% de mortalidade na maior concentração, próximo ao 5º dia, enquanto na concentração inferior morreram 77% em média próximo ao 6º dia (Tabela 11).

Tabela 11. Índice e tempo de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* após exposição ao fungo e alimentadas com dieta acrescida de glifosato e novaluron.

Produto	Concentração	Índice de mortalidade (%)	Tempo (dias)
Glifosato ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Controle	0	0,0
	6,25	10	11,3
	12,5	23	9,9
Novaluron ($\mu\text{L}/100\text{mL}$)	Controle	0	0,0
	6,3	100	4,5
	12,5	100	4,6
<i>M. rileyi</i> (conídios/mL)	Controle	0	0
	10^7	77	5,6
	10^9	100	4,8

Em estudos com outras espécies de insetos verificou-se que o glifosato afeta negativamente a sobrevivência de *Chrysoperla externa* (Schneider *et al.*, 2009) e também afeta a longevidade do hemíptero *Palmistichus elaeisis* (Lacerda, 2008). Essa redução na longevidade pode estar relacionada à presença da molécula do glifosato na constituição da pupa, alterando alguma rota metabólica nos insetos (Andow & Hilbeck, 2004).

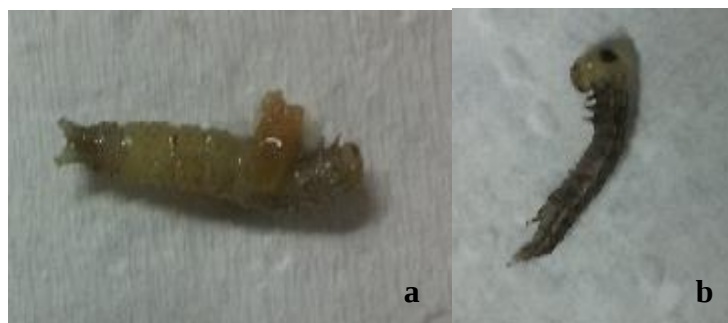


Figura 3. Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* mortas pela ação do inseticida novaluron. a) Ação do inseticida no epitélio intestinal. b) Ação do inseticida na ecdise.

As fêmeas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle ovipositaram de forma contínua durante todo o período avaliado, sendo que a maior oviposição ocorreu no 3º dia com aproximadamente 30 ovos/fêmea. O maior pico de oviposição ocorreu no 4º dia com as lagartas expostas ao fungo *M. rileyi*, as fêmeas ovipositaram cerca de 100 ovos. Porém, exceto a oviposição que ocorreu nesse dia de pico, foi possível evidenciar que do 1º ao 3º dia, assim como do 6º ao 10º dia, que a quantidade de ovos depositados nesses dias foi mínima. Para as lagartas alimentadas com glifosato foi possível constatar que a oviposição ocorre de maneira semelhante, sendo que o pico foi no 4º dia. Na menor concentração ocorreu maior oviposição, próximo a 60 ovos, já na maior concentração a oviposição foi inferior a 40 ovos no seu dia de pico. Para ambas as concentrações evidenciou-se que tanto antes quanto após o dia de pico a oviposição é próxima a zero (Figura 4).

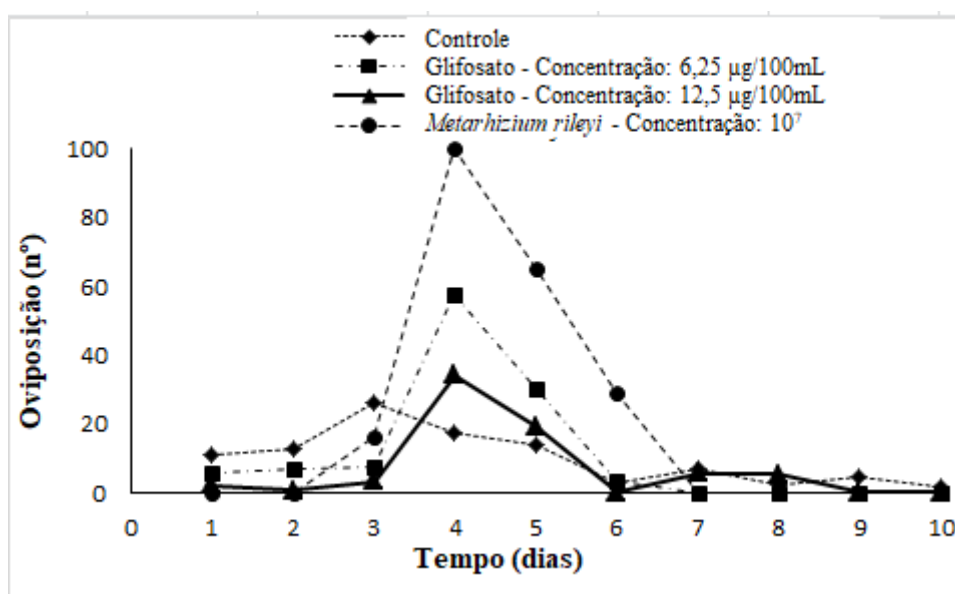


Figura 4. Número de ovos por fêmea de *Anticarsia gemmatalis* provenientes de bioensaios com o fungo e de ensaios com dieta contendo herbicida e inseticida.

A eclosão dos ovos apresentou variações: do 1º ao 5º dia foi 100%, do 6º ao 8º dia cerca de 50% e após o 8º dia a porcentagem de eclosão voltou a subir, até atingir 100% no 10º

dia. Em presença do glifosato observou-se uma instabilidade na eclosão dos ovos, sendo que apenas no 3º dia os ovos da maior concentração apresentaram 100% de eclosão. Do total de ovos postos, apenas 34,8% eclodiu, indicando baixa fertilidade (Figura 5). Em relação aos ovos dos insetos provenientes dos ensaios com o fungo *M. rileyi* a maior eclosão ocorreu no 3º dia (cerca de 60%) (Figura 6).

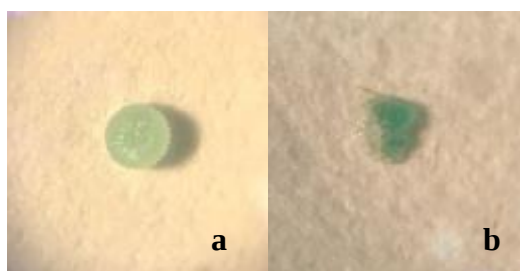


Figura 5. Ovo de *Anticarsia gemmatalis* antes da eclosão (a) e após a eclosão (b).

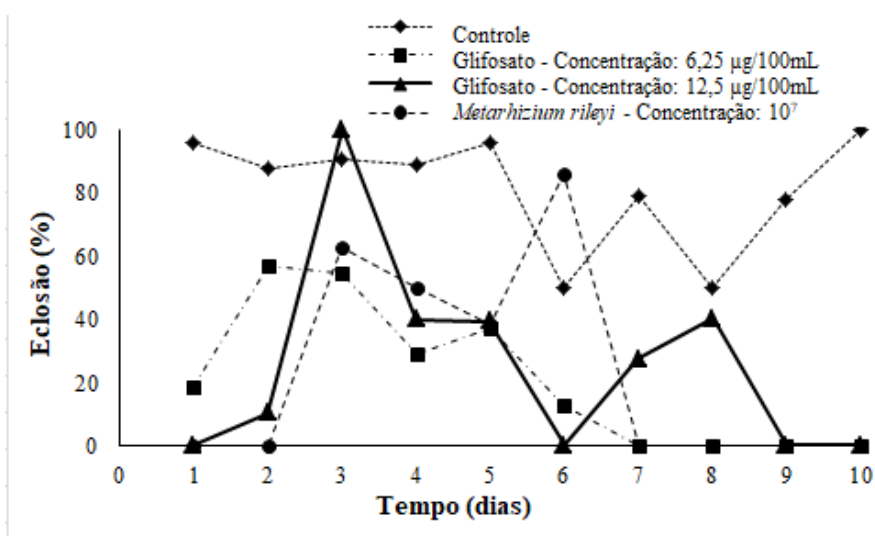


Figura 6. Percentual de eclosão de ovos de *Anticarsia gemmatalis*, em ensaios com o fungo e com dieta contendo glifosato.

Assim como no presente estudo, Scheneider *et al.*, (2009) observaram que tanto a fecundidade quanto a fertilidade foram afetadas negativamente pelo glifosato em *Chrysoperla externa*. Da mesma forma que Manzoni *et al.*, (2006) haviam constatado a redução da

fecundidade no parasitóide *Trichogramma pretiosum* e (Yasmin & D'Souza, 2007) na minhoca *Eisenia foetida*.

Foi possível verificar que o glifosato pode causar malformações em pupas e adultos em ensaios com dieta contendo glifosato (Figura 7). Correira *et al.*, (2015) também identificaram alterações morfológicas em minhocas *Eisenia foetida* após 30 dias de exposição ao glifosato, assim como Scheneider *et al.*, (2009) em *Chrysoperla externa*.

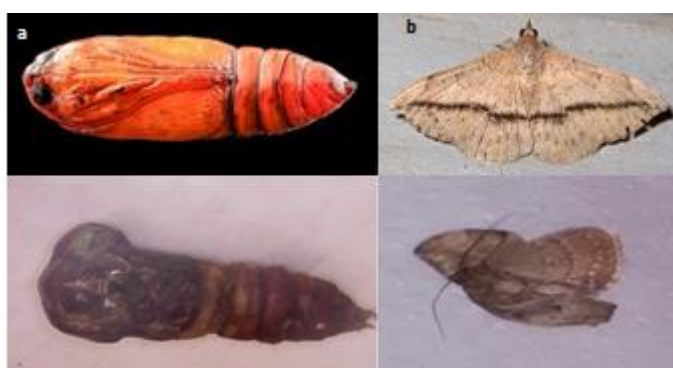


Figura 7. (a) Pupa de *Anticarsia gemmatilis* normal e pupa com malformação; (b) Adulto de *Anticarsia gemmatilis* normal e adulto com malformação ocasionada pela ação do glifosato.

A questão sobre os efeitos do glifosato em organismos não alvo ainda é uma polêmica, e pouco avanço tem sido observado em estudos e práticas com o objetivo de preservar os inimigos naturais. Levando em consideração os estudos citados ao longo do trabalho, sobre os efeitos deste herbicida sobre organismo não alvo, causando alterações de desenvolvimento, morfológicas, fisiológicas e imunológicas, é importante atentar para o potencial de risco de toxicidade aos inimigos naturais associados ao agrossistema como um todo (Scheneider *et al.*, 2009).

5.3 Determinação de marcadores do metabolismo redox

Na análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não houve diferença significativa entre as concentrações (6,25 µL/100mL e 12,5 µL/100mL), nem destas

em relação ao controle em nenhum dos dias avaliados (8, 10 e 12 dias) após o início da alimentação das lagartas com glifosato, indicando que não houve geração de danos oxidativos à lipídeos (Figura 8a).

Nos ensaios de determinação do óxido nítrico (ON) houve efeito de concentração para todas as avaliações realizadas. Na primeira avaliação que foi realizada no 8º dia após o início da alimentação com dieta contendo herbicida a menor concentração apresentou valores menores em relação ao controle e a maior concentração, sendo uma diferença significativa, já a maior concentração e o controle tiveram comportamento semelhante. Na segunda avaliação, a menor concentração não diferiu do controle, porém, a maior concentração constatou-se uma redução significativa quando comparado a menor concentração e ao controle. No 12º dia, a menor concentração equivaleu-se ao controle e a maior concentração, entretanto houve uma diminuição significativa da maior concentração em relação ao controle (Figura 8b).

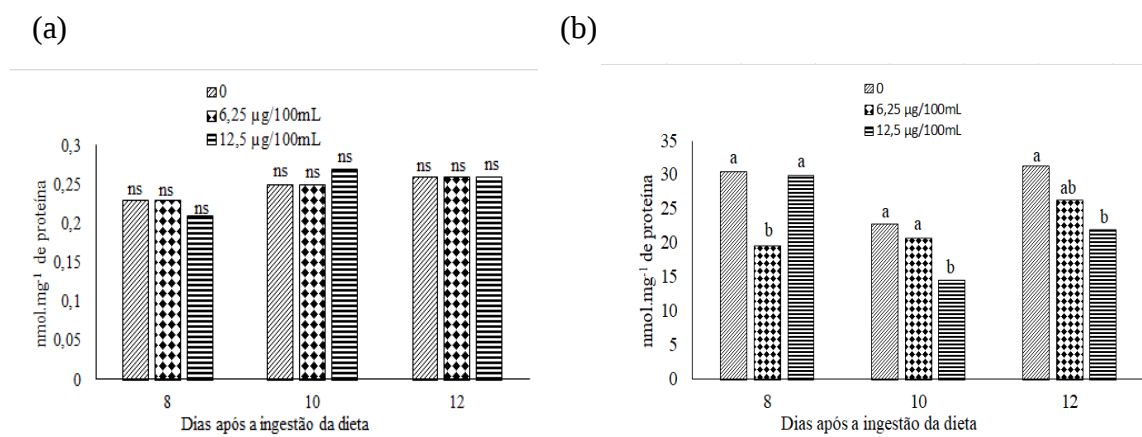


Figura 8. (a) Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e (b) óxido nítrico em *Anticarsia gemmatilis*, avaliado aos 8, 10 e 12 dias após exposição a dieta com diferentes concentrações de glifosato. (a)^{ns}: não significativo pelo teste de ANOVA, a 5% de probabilidade. (b)¹ Médias seguidas de letras idênticas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não houve efeito de concentração; na menor concentração a atividade de SOD está elevada demonstrando

diferença significativa quando comparada ao controle, já a maior concentração não apresenta diferença significativa em relação a menor concentração e ao controle (Figura 9a). O aumento da atividade da SOD pode estar indicando um aumento na geração do radical superóxido. Para a atividade da enzima catalase (CAT) não houve efeito de concentração para as avaliações realizadas no dia 10 e 12, apenas efeito na avaliação de 8 dias. Na primeira avaliação após o início da alimentação das lagartas com glifosato, a menor concentração ocasionou um aumento na CAT apontando diferença significativa em relação a maior concentração, contudo não diferiu do controle. A menor concentração não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle em nenhuma das três avaliações (Figura 9b).

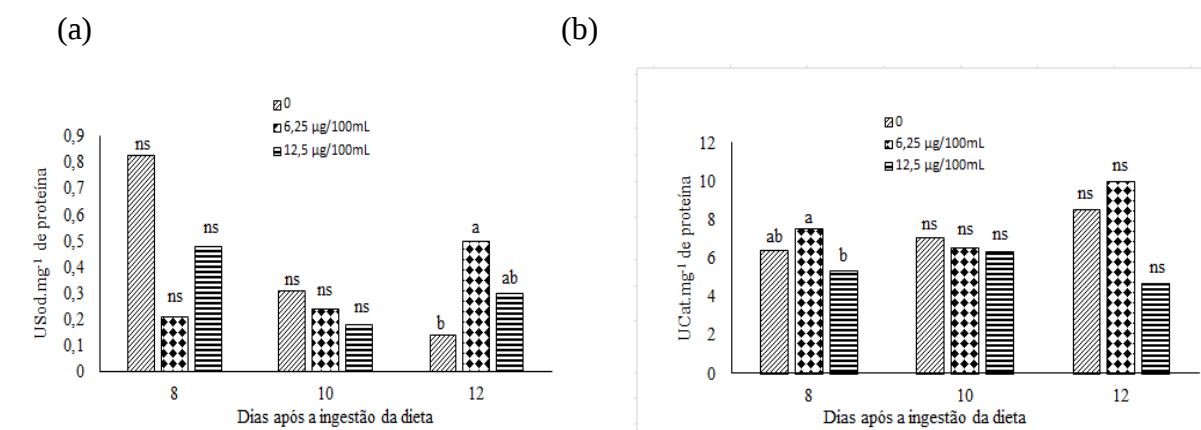


Figura 9. (a) Atividade da enzima superoxido dismutase (SOD) e (b) catalase (CAT) de *Anticarsia gemmatilis*, avaliado aos 8, 10 e 12 dias após exposição a dieta com diferentes concentrações de glifosato. (a) ^{ns}: não significativo pelo teste de ANOVA, a 5% de probabilidade; ¹ Médias seguidas de letras idênticas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade na avaliação realizada aos 12 dias após a ingestão da dieta. (b) ^{ns}: não significativo pelo teste de ANOVA, a 5% de probabilidade; ¹ Médias seguidas de letras idênticas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade na avaliação realizada aos 8 dias após a ingestão da dieta.

Menezes *et al.*, (2011) evidenciaram que o glifosato induz estresse oxidativo no jundiá *Rhamdia quelen*. Porém, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que glifosato não gerou estresse oxidativo nas lagartas de *A. gemmatilis*. Essa situação pode ter sido devido às

baixas concentrações de glifosato utilizadas (6,25 µL/100mL e 12,5 µL/100mL), as quais correspondem a 12,5% e 25% da dose recomendada em campo.

Assim como as lagartas de *A. gemmatilis* do presente estudo, as moscas *D. melanogaster* expostas ao glifosato respondem aos estressores através de uma elevada indução do sistema de defesa antioxidante (De Aguiar *et al.*, 2016).

Os resultados do presente estudo diferem dos obtidos por El-Shenawy (2009), o qual observou um aumento no dano lipídico concomitante a uma redução nos níveis de glutathione (GSH) em ratos expostos ao glifosato. Além disso, no peixe surubim (*Sorubimichthys planiceps*), um aumento nos danos às proteínas e aos lipídios foi encontrado (Sinhorin *et al.*, 2014). Modesto & Martinez (2010) relataram aumento da peroxidação lipídica nas espécies de peixes *Prochilodus lineatus* após exposição ao glifosato.

Entretanto, apesar de não ocorrer estresse oxidativo em *A. gemmatilis*, é possível identificar uma modulação no sistema de defesa antioxidante CAT e SOD. Estas enzimas atuam na defesa primária, ou seja, detoxificando o agente (Sies, 1993; Vasconcelos *et al.*, 2014). A catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e a superóxido dismutase converte oxigênio em peróxido de hidrogênio que se torna substrato para as outras duas enzimas (Sies, 1993).

Langiano & Martinez (2008) observaram um aumento na atividade da catalase no peixe *P. lineatus* quando exposto ao glifosato, assim como Nwani *et al.*, (2013) verificaram aumento na superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase de forma dependente da concentração em *Channa punctata*. Estudos já demonstram que os organismos são capazes de melhorar este sistema a fim de combater os estressores como EROs (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O óxido nítrico (ON) efetua um processo fundamental na resposta imune de invertebrados, inclusive insetos, na resposta à patógenos e outras condições de estresse

(Faraldo *et al.*, 2005; Foley & O'Farrell, 2003). Sabe-se ainda, que este pode exercer um papel importante na metamorfose inicial dos insetos, como observado em *Drosophila* (Caceres *et al.*, 2011), demonstrando que esta molécula está associada a relevantes processos biológicos em relação ao metabolismo e ao comportamento (Yamanaka & O'Connor, 2011).

Dessa forma compreende-se a diminuição nos níveis de óxido nítrico visto neste estudo, devido ao fato das lagartas estarem no último ínstar de desenvolvimento ou pré-pupa, e o ON é importante na metamorfose inicial dos insetos.

5.4 Sensibilidade do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* ao glifosato e novaluron

A aplicação de agroquímicos em geral necessita conhecimento da ação desses produtos sobre os fungos para determinar sua compatibilidade. (Batista Filho *et al.*, 2001). Alguns agroquímicos podem ter efeito tóxico sobre os fungos entomopatogênicos comprometendo sua ação no controle de pragas e também o uso em uma estratégia de manejo integrado (Botelho & Monteiro, 2011).

Nas análises do crescimento micelial e esporulação de *M. rileyi*, verificou-se interação entre produtos e concentrações (Tabela 12).

Os valores do crescimento micelial, esporulação e quantificação de colônias estão expressos em percentuais em relação ao controle.

Tabela 12. Crescimento micelial e esporulação de *Metarhizium rileyi*, relativo ao controle, em Saboraud Maltose Ágar (SMAy) acrescido de inseticida e herbicida.

Produto	Concentração ¹ (% da DR)	Crescimento micelial (%)	Esporulação (%)
Novaluron	12,5%	89,58 a A	85,60 a A
	25%	89,63 a A	69,57 b A
	50%	87,32 a A	48,63 c A
	100%	76,28 b A ²	34,54 d A
Glifosato	12,5%	82,28 a B	36,34 a B
	25%	72,19 b B	23,75 b B
	50%	50,03 c B	18,44 bc B
	100%	31,09 d B	6,10 c B
C.V. (%) ³		7,37	9,27

¹ Concentração baseada na dose recomendada (DR) de 0,05L/ha de novaluron (produto comercial Rimon[®]) e 0,5Kg/ha de glifosato (produto comercial Roundup WG[®]); ² Médias seguidas de letras idênticas minúsculas comparando concentrações e, maiúsculas comparando produtos nas referidas concentrações, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ³ C.V.= coeficiente de variação.

Em relação ao crescimento micelial do fungo quando inoculado em meio de cultura contendo o inseticida novaluron, somente na concentração de 100% (DR) constatou-se redução significativa. Entretanto, em meio de cultura contendo o herbicida glifosato observou-se diferença significativa de crescimento micelial entre todas as concentrações, sendo possível observar que quanto maior a concentração menor foi o crescimento e na concentração 100% (DR) com apenas 31,09% de crescimento quando comparado ao controle. Na comparação entre produtos observou-se que o herbicida foi o que mais afetou o crescimento (Tabela 12).

Considerando-se a esporulação verificou-se diferença significativa entre as concentrações de novaluron, com redução de esporulação à medida que a concentração do inseticida aumenta. Isto também foi observado com o glifosato (Tabela 12).

Tanto o inseticida novaluron como o herbicida glifosato influenciam no crescimento micelial de *M. rileyi* de maneira negativa e dose dependente, ou seja, conforme aumenta a concentração dos agroquímicos ocorre diminuição do crescimento micelial; porém, a ação do glifosato é bem mais acentuada comparativamente ao inseticida (Figura 10).

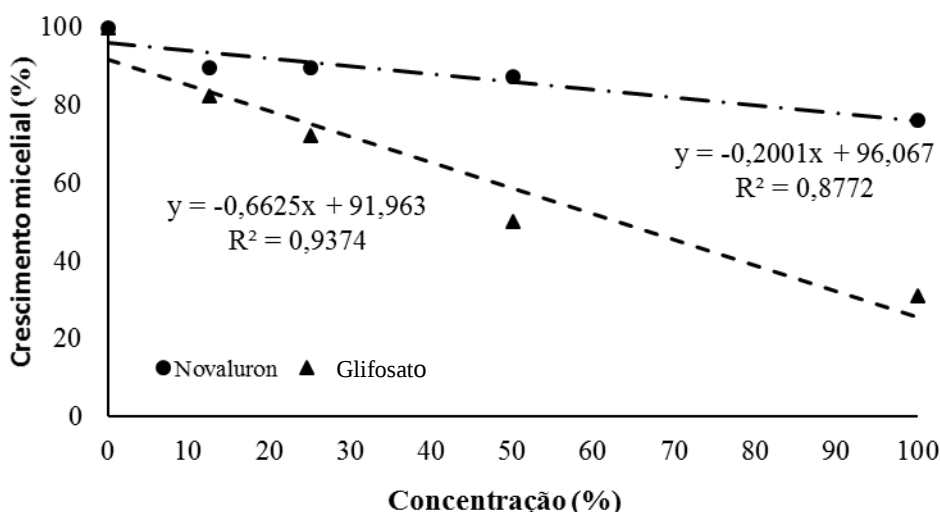


Figura 10. Crescimento micelial do fungo *Metarhizium rileyi* em diferentes concentrações de glifosato.

Em relação à esporulação do fungo *M. rileyi* após a inoculação em solução contendo o novaluron e o glifosato pode-se observar que, em geral, houve redução mais acentuada até a concentração de 50% da dose recomendada (Figuras 11 e 12). Também, pode-se observar maior redução com o herbicida glifosato, comparativamente ao inseticida novaluron, observados pelo menor valor do parâmetro x das equações (-1,41 para novaluron e -2,50 para glifosato) (Figura 11).

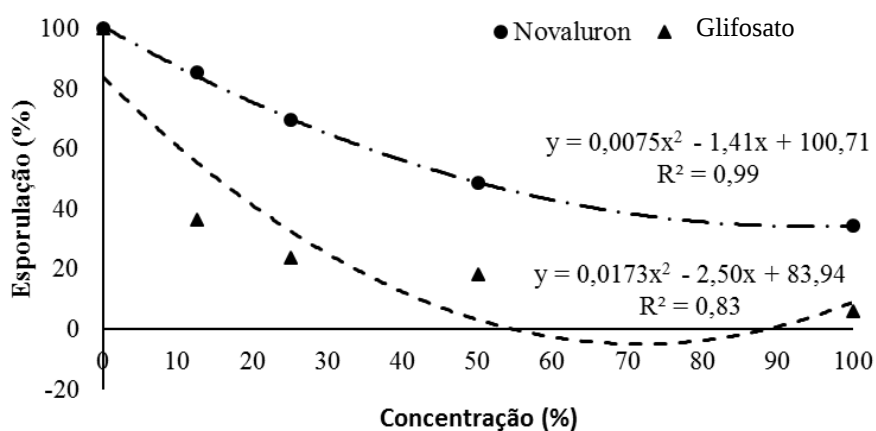


Figura 11. Esporulação de *M. rileyi* em meio SMAy com novaluron e glifosato

No percentual de colônias ocorreu efeito isolado de concentração e de produto, sem interação entre os fatores, sendo que os valores encontrados apresentaram mesmo comportamento, possibilitando realizar uma média dos dois produtos (Tabelas 13).

Tabela 13. Percentual de colônias de *Metarhizium rileyi*, relativo ao controle, desenvolvidas em meio de cultura Sabourand Maltose Ágar (SMAy) contendo inseticida e herbicida.

Concentração (%) ¹	Colônias (n°)
12,5	90,00 a
25	83,13 b
50	77,37 c
100	65,74 d ²
C.V. (%) ³	3,87

¹ Concentração baseada na dose recomendada de 0,05L/ha de novaluron (produto comercial Rimon[®]) e 0,5Kg/ha de glifosato (produto comercial Roundup WG[®]); ² Médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ³ C.V.= coeficiente de variação.

O número de colônias foi diferente estatisticamente entre todas as concentrações, sendo que à medida que a concentração dos produtos aumentou a quantidade de colônias diminuiu (Tabela 13).

Na comparação entre os produtos testados, o maior número de colônias foi observado nos meios com o inseticida novaluron, seguido pelo herbicida glifosato (Tabela 14).

Tabela 14. Percentual de colônias de *Metarhizium rileyi*, relativo ao controle, desenvolvidas em meio de cultura Sabourand Maltose Ágar (SMAy) contendo novaluron e glifosato.

Tratamentos	Colônias (n°)
Novaluron	84,10 a ¹
Glifosato	74,01 b
C.V. (%) ²	2,09

¹ Médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; ² C.V.= coeficiente de variação

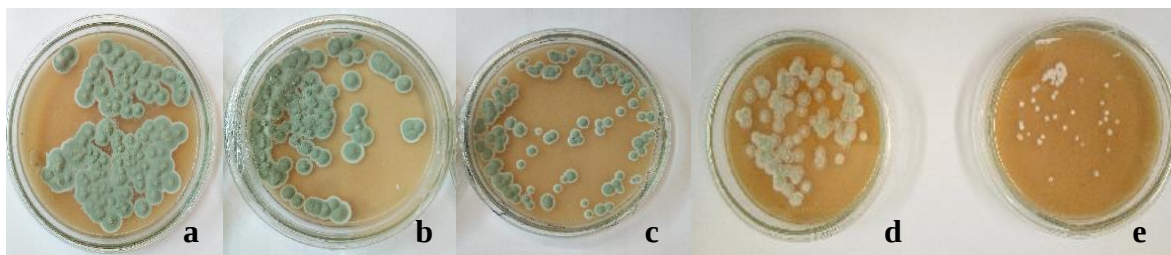


Figura 12. Sensibilidade de *Metarhizium rileyi* ao herbicida glifosato. a) Controle; b) Concentração 12,5% DR; c) Concentração 25% DR; d) Concentração 50% DR; e) Concentração 100% DR

Esses resultados se assemelham aos obtidos por Botelho & Monteiro (2011) que evidenciaram que o herbicida glifosato causa redução no crescimento micelial e produção de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, assim como Andaló *et al.*, (2004) já havia verificado o mesmo para *B. bassiana*. De maneira geral, os mesmo autores classificaram o glifosato como compatível com *M. anisopliae* apenas na dose recomendada em pré-emergência (DRPE) e moderadamente tóxico na dose recomendada em pré-emergência+50% (DRPE+50%), dose recomendada em pós emergência (DRPO) e dose recomendada em pós emergência+100% (DRPO+100%), já *B. bassiana* demonstrou ser compatível com glifosato somente nas doses DRPE e DRPE+50%.

Dutra *et al.*, (2013) e Sosa-Gomez (2005) já haviam constatado redução na produção de conídios de *M. rileyi*, independente da dose de glifosato testada.

Corroborando com nossos resultados, Costa *et al.*, (2004) apontaram que o glifosato na dose de 0,5 L/ha reduz significativamente a esporulação de *M. anisopliae*, porém, ao contrário do nosso achado, não afeta o crescimento vegetativo. Um trabalho realizado com *B. thuringiensis*, demonstrou resultados de acordo com esse estudo, ou seja, em ambas as concentrações testadas nos dois períodos avaliados impossibilitaram a formação de colônias, não sendo possível quantificar, assim, o herbicida foi classificado como incompatível com o entomopatógeno (Silva *et al.*, 2008; Agostini *et al.*, 2012). Rampelotti-Ferreira *et al.*, (2010)

também verificaram que o glifosato pode interferir na esporulação de *M. anisopliae*, sendo classificado como moderadamente tóxico.

Assim como no presente estudo, o glifosato inibiu significativamente a germinação e interferiu no crescimento micelial de todos os isolados de *B. bassiana* (Fregonesi *et al.*, 2016). De acordo com Batista Filho *et al.* (2001), é normal ocorrer diferença de efeito entre diferentes entomopatógenos e até mesmo entre estirpes de um mesmo agente, pois a toxicidade de produtos químicos pode variar para os diferentes isolados devido as suas diferenças de sensibilidade.

Não foram encontrados estudos referentes à compatibilidade entre novaluron e *M. rileyi*. Porém, conhecendo o modo de ação deste inseticida, na qual atua sobre um número restrito de insetos, em especial lepidópteros, compreende-se porque este causou menor impacto entomopatógeno (Ishaaya *et al.*, 1996; Cutler *et al.*, 2005).

Apesar dos efeitos de novaluron sobre *M. rileyi* terem sido em menor escala, as alterações que ocorreram como a inibição da germinação e possíveis mutações que altaram a patogenicidade ou a virulência do fungo já haviam sido descritas por Borges & Nova (2011), sendo que esses efeitos podem variar de acordo com a espécie/isolado do entomopatógeno utilizado e do produto testado (Tanzini *et al.*, 2002; Alizadeh *et al.*, 2007).

Inseticidas como Temik 150®, Actara 250 WG®, Regente WG 800® foram avaliados em relação ao entomopatógeno *B. bassiana* (Fregonesi *et al.*, 2016). Um estudo de Botelho & Monteiro (2011) com Temik 150® já havia constatado que tal inseticida afeta *B. bassiana*, inibindo completamente a germinação, o crescimento e a esporulação. Ao contrário no presente trabalho Actara 250 WG® não interferiu significativamente na esporulação de *B. bassiana*, apresentando compatibilidade entre estes (Gassen *et al.*, 2008; Botelho & Monteiro, 2011). Corroborando com nosso trabalho, o inseticida Regente WG 800® inibiu o crescimento, porém não afetou significativamente *B. bassiana*. Batista Filho *et al.* (1996) e

Moino Jr. & Alves (1998), também verificaram efeito desse inseticida sobre o crescimento das colônias e ausência de grandes variações na esporulação.

É de suma importância avaliar esta compatibilidade, visto que a combinação do controle químico e do biológico no manejo integrado de pragas (MIP) tem o objetivo de maximizar a eficácia no controle de pragas, de forma segura (Gentz et al., 2010). Inseticidas e agentes de controle biológico estão sendo cada vez mais usados em conjunto para controlar pragas, incluindo espécies invasoras (Dent, 2000; Oi *et al.*, 2008; Gentz *et al.*, 2010).

6. DISCUSSÃO GERAL

Uma estratégia importante para o controle de pragas é a utilização do Manejo Integrado de Pragas (MIP), sendo que esse refere-se à integração de diferentes ferramentas de controle, tais como os produtos químicos, agentes biológicos (predadores, parasitóides e entomopatógenos - bactérias, fungos ou vírus), extratos de plantas, feromônios, variedades de plantas resistentes à pragas, manejo cultural, plantas iscas, liberação de machos estéreis, dentre outras.

Conforme evidenciado é de fundamental importância o conhecimento do mecanismo de ação dos agentes utilizados. Sabe-se que os inseticidas atuam de diferentes formas, sendo que podem ser neurotóxicos, reguladores de crescimento (fisiológicos), inibidores de processos metabólicos, fagoderretes ou desintegradores do mesêntero. O novaluron é um inseticida que precisa ser ingerido pelo inseto e após sua ação ocorre inibindo a síntese da quitina, impedindo a formação da cutícula do inseto, por isso ele é considerado um regulador de crescimento.

Em relação ao mecanismo de ação do herbicida glifosato, ele inibe a ação da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), e conseqüentemente a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais à via do ácido chiquímico como a fenilalanina, tirosina e triptofano. Existem outros ainda que podem ser inibidores da divisão celular, do crescimento inicial, da fotossíntese, da síntese de pigmentos e etc.

Os agentes biológicos apresentam mecanismos de ação são bem distintos dos agentes químicos. Dentre os agentes microbianos os fungos possuem vantagens quando comparados aos demais agentes biológicos, bem como aos químicos, devido as duas formas de contato: via oral e via tegumento. Inicialmente eles aderem ao hospedeiro, germinam, formam o

apressório e o grampo, penetram, colonizam, se reproduzem e disseminam. Os insetos infectados perdem a mobilidade, apresentando o corpo rígido e quebradiço.

Após os agentes invasores (químicos ou biológicos), ultrapassarem o tegumento e o trato digestivo, ficam expostos a diversos mecanismos celulares e humorais interagindo na defesa do hospedeiro. A resposta humoral realiza os processos de coagulação da hemolinfa e melanização quando os agentes patogênicos são numerosos ou muito grandes para fagocitar. Já a defesa celular é constantemente ativada para fagocitar, armazenar e distribuir nutrientes, encapsular e formar de nódulos em tornos dos agentes a fim de eliminá-los, conforme visto no presente trabalho quando os insetos ingeriram a dieta contendo glifosato ou novaluron e tiveram contato com o fungo entomopatogênico.

O MIP requer acompanhamento constante para fazer previsões sobre a ocorrência de problemas fitossanitários aplicando sistemas de monitoramento adequados com níveis de precisão aceitáveis, e assim permitindo adotar ou não estratégias de controle.

Considerando que o Brasil lidera o ranking mundial de exportação do complexo soja e é o sendo o segundo maior produtor mundial desta leguminosa, compreende-se a importância econômica dessa cultura para o país.

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até à colheita e com o objetivo de evitar as perdas que podem ultrapassar 15% da produção, se as pragas não forem controladas, o número de aplicações de inseticida eleva drasticamente sem critérios técnicos levando ao uso abusivo de agrotóxicos, com a utilização média de 4 à 6 aplicações por safra dependendo da localidade e ano, fazendo com que o Brasil ocupe o primeiro lugar no *ranking* mundial de consumidores destes produtos.

Essa prática é insustentável, tanto no aspecto econômico quanto no ambiental. O uso errôneo de agrotóxicos desequilibra o ambiente, consequentemente estimulando o aumento de pragas secundárias e também favorece ressurgência das pragas e a seleção de pragas

resistentes aos inseticidas utilizados. Dessa forma, compreende-se a importância e necessidade de implantação do MIP.

Estudos apontam vantagens econômicas significativas após a consolidação deste, visto que possibilitam o estabelecimento de um controle permanente, de modo a manter a população da praga sob controle após sucessivas aplicações, pois o agente microbiano tende a ficar inoculado no solo e ser estimulado quando necessário, sendo assim, com a redução no uso de agrotóxicos, os produtores podem ter custos menores de produção com a compra de inseticidas.

Outra vantagem do controle biológico, é que os índices de aparecimento de resistência são considerados baixos, devido ao fato dos agentes microbianos serem organismos que evoluem geneticamente de forma constante, ao contrário dos químicos que além de possuírem elevada toxicidade são formulações constantes.

Os principais obstáculos podem ser de caráter técnico, num primeiro momento, financeiro, educacional, de organização e social. Dentre os obstáculos técnicos, o monitoramento e a determinação dos níveis de ação são os principais entraves. Para melhoria do monitoramento, as análises laboratoriais podem ser uma boa solução, visto que auxiliam o agricultor e seu responsável técnico na escolha das estratégias para o controle da praga na cultura em questão.

Para realização do presente trabalho, foram efetuados inúmeros testes piloto antes de iniciar os experimentos aqui apresentados. A determinação das concentrações dos agroquímicos a serem usadas nos ensaios foi realizada por meio de bioensaios partindo-se da recomendada à campo, na qual ocorre 100% de mortalidade das lagartas. Nessa concentração verificou-se a mortalidade dos insetos antes que os mesmos atingissem o tamanho necessário para coleta da hemolinfa. Desta forma foram testadas concentrações menores, selecionando-se para os ensaios as correspondentes a 12,5% e 25% da concentração recomendada à campo, as

quais permitiram a sobrevivência dos insetos para a coleta da hemolinfa. Com o inseticida novaluron foi necessário trabalhar com lagartas de 5º ínstar visto que são mais resistentes.

A partir dos experimentos realizados, as maiores alterações no sistema imune dos insetos foram observadas após as lagartas ingerirem dieta contendo o inseticida novaluron. Foi possível constatar que apesar das tentativas de defesa para eliminar a molécula, os hemócitos não foram eficazes gerando um colapso no sistema imune. Nas avaliações realizadas em bioensaios com o fungo entomopatogênico *M. rileyi*, observou-se que alterações no sistema imune são mais tardias e amenas, inclusive na menor concentração ocorreu a atenuação da ação do entomopatógeno. Já a ação do herbicida glifosato foi mais discreta, sendo possível observar que logo após a infecção o sistema imune é ativado e atua na eliminação da molécula e recuperação das lagartas.

No presente estudo constatou-se a influência do herbicida glifosato no crescimento micelial e esporulação do fungo entomopatogênico podendo comprometer sua eficácia. Dessa forma sugere-se mais estudos relacionados ao intervalo de aplicação entre os dois agentes a fim de que possam ser utilizados sem que ocorram interferências nos respectivos mecanismos de ação.

Além dos efeitos que o glifosato ocasiona em agentes entomopatogênicos como foi observado neste trabalho, este deve ser utilizado cada vez mais de forma cautelara, pois estudos recentes demonstram sua genotoxicidade a humanos expostos de forma crônica, podendo ocasionar autismo, câncer de diversos tipos, Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e síndrome de Rett, além de sugerirem forte correlação entre crianças com diagnóstico de déficit de atenção / transtorno de hiperatividade (TDAH) ou transtorno de déficit de atenção (ADD). Esses fatores não são observados com o uso do controle biológico, visto que este é altamente específico.

Além destes organismos, estudos demonstram que o glifosato influencia a densidade populacional, diversidade genética e fisiologia das bactérias endofíticas. Essas bactérias podem conferir ao seu hospedeiro, características como maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, suprimento de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal.

Conhecendo as formas de ação, ficam evidentes as vantagens do controle biológico, visto que são específicos ao inseto praga, não ocasionam efeitos maléficos aos inimigos naturais; podem ser utilizados em associação com os inseticidas químicos em subdosagens, possibilitando uma ação sinérgica e mais eficiente; além de possuírem facilidade de cultivo in vitro.

É importante salientar que os testes foram realizados em âmbitos laboratoriais na qual as condições são absolutamente controladas e propícias, tais como temperatura, umidade, disponibilidade de alimento adequado sem chance de escolha, além de estarem livres de intempéries do tempo como a chuva. Para transferência desta prática para campo, é necessário levar em conta todos esses fatores. Dessa forma, é importante que sejam realizados testes piloto em pequenas áreas antes que a técnica seja implementada em grande escala.

Os agentes biológicos apresentam benefícios quando comparados ao controle químico na aplicação em campo, sendo de fácil dispersão, podendo ser favorecidos pelo vento e ainda multiplicam-se de forma numerosa, também não geram resíduos no solo e na água, que possam ser prejudiciais a outros organismos.

Portanto, é fundamental para os seres humanos e o ecossistema de maneira geral, que constantemente sejam realizados estudos e adotadas práticas sustentáveis e conscientes que garantam produtividade, lucros elevados além de um meio ambiente íntegro.

7. CONCLUSÕES

- O inseticida novaluron causa alterações no sistema imune, sendo essas irreversíveis e em um tempo menor quando comparado ao *M. rileyi*;
- O fungo *M. rileyi* na maior concentração altera o sistema imune da lagarta de forma mais lenta, enquanto na menor concentração, algumas lagartas foram capazes de atenuar o efeito do entomopatógeno, porém, observou-se alterações significativas nos parâmetros biológicos;
- O herbicida glifosato ocasiona alterações no sistema imune e na fertilidade de *A.gemmatalis*, porém, o inseto é capaz de atenuar os efeitos sobre o sistema imune;
- O inseticida novaluron e a maior concentração do fungo *M. rileyi* ocasionaram morte de 100% das lagartas, impossibilitando a avaliação dos parâmetros biológicos;
- O herbicida glifosato altera as defesas antioxidantes, porém não ocasionou estresse oxidativo para os marcadores avaliados;
- Na avaliação da sensibilidade do fungo aos agroquímicos, tanto o glifosato como o novaluron interferem no crescimento micelial e na esporulação do entomopatógeno.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para complementar os resultados sobre os mecanismos de ação dos agentes de controle químicos e biológico, sugere-se para estudos futuros a realização do teste cometa para avaliar se ocorrem lesões ao DNA da lagarta, além do teste do micronúcleo; avaliar o metabolismo redox de *A. gemmatilis* quando alimentada com o inseticida novaluron e exposta ao fungo entomopatogênico; avaliar a sensibilidade do fungo em relação a outros agroquímicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achiorno, C.L.; Villalobos, C.; Ferrari, L. (2008). Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). **Chemosphere** 71: 1816–1822
- Adama. *Informações Técnicas Rimon SUPRA®*. **Disponível (online):** <http://www.adama.com/brasil/pt/Images/Rimon%20Supra_tcm14-2199.pdf>. (02 jul. 2015).
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology** 105: 121–126.
- Agrofit. *Consulta de produtos formulados*. **Disponível (online):** <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. (30 jun. 2015).
- Alizadeh, A.; Samih, M.A.; Khezri, M.; Riseh, R.S. (2007). Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. **International Journal of Agriculture and Biology**, 9:31-34.
- Alvarez-Moya, C.; Silva, M.R.; Ramírez, C.V.; Gallardo, D.G.; Sánchez, R.L.; Aguirre, A.C.; Velasco, A.F. (2014). Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. **Genetic and Molecular Biology**. 37:05–10.
- Alves, S.B. (1998). **Fungos Entomopatogênicos**. In: Controle Microbiano de Insetos, Alves, S. B. Editor. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ - Piracicaba/SP. 289 -381.
- Amarante, J.R.O.P.; Santos, T.C.R. (2002). Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**. 25: 420 – 428.
- Andaló, V.; Moino Junior, A.; Santa- Cecília, L.V.C.; Souza, G.C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with chemical pesticides for the control of the coffee root mealybug *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.33, n.4, p.463-467, 2004.
- Andersen, S.O. (1979). Biochemistry of insect cuticle. **Annual review of entomology**. 24: 29-59.
- Andrade JR., D.R.; Souza, R.B; Santos, S.A. Dos; Andrade, D.R. (2005). Os Radicais Livres de Oxigênio e as Doenças Pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 31.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2005). Agrotóxicos. Brasília: 25-58. **Disponível (online):** <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>. (11 jul. 2015).
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2015). Carcinogênese de cinco agrotóxicos. **Disponível (online):**

http://portal.anvisa.gov.br/noticias?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=220456&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=anvisa-esclarece-sobre-carcinogenicidade-de-cinco-substancias-comercializados-no-pais. (12 de jul. 2016).

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2016). Glifosato. **Disponível (online):** <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>. (01 de jul. 2016).

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Glifosato prossegue sob análise na Anvisa. **Disponível (online):** http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/glifosato-prosegue-sob-analise-na-anvisa/219201/pop_up?inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fweb%2Fguest%2Fnoticias%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dpop_up%26p_p_mode%3Dview%26p_r_p_564233524_tag%3Dagrot%25C3%25B3xicos

Andow, D.A.; Hilbeck, A. (2004). Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**. 54: 637-649.

Ashida, M.; Brey, P. (1998). Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey, P., Hultmark, D. (Eds.). **Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects**. Chapman & Hall. London, pp.135–172.

Arias, J.R.; Mulla, M.S. (1975). Postemergence effects of two insect growth regulators on the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. 12: 317-322.

Ayaad, T.H.; Dorrah, M.A.; Shaurub, E.H.; El-Sadawy, H.A. (2001). Effects of the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and azadirachtin on the immune defense response and prophenoloxidase of *Parasarcophaga surcoufi* larvae (Diptera: Sarcophagidae). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 31: 295–325.

Bannister, J.V.; Calabrese, L. (1987) Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**. 32: 279–312.

Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Lamas, C. (2001). Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**. 30: 437-447.

Beetz, S.; Holthusen, T.K.; Koolman, J.; Trenczek, T. (2008). Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 67: 63–75.

- Benamú, M.A.; Schneider, M.I.; Sánchez, N.E.; (2010). Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. **Chemosphere**. 78: 871–87.
- Berti Filho, E.; Ciociola, A.I. 2002. Parasitóides ou Predadores? Vantagens e desvantagens. In: Parra, J. R. P.; Botelho, P. S. M. Corrêa- Ferreira, B. S; Bento, J. M.S. (2002). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.29-43.
- Borges, L.R.; Nova, M.X.V. (2011) Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no Manejo Integrado de Pragas – uma revisão. **Ambiência**, 7: 179 – 190.
- Bortoli, G.M.; Azevedo, M.B.; Silva, L.B. (2009). Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research**. 675:1-4.
- Botelho, A.A.A; Monteiro, A. C. (2011). Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia**. 70:361-369.
- Botelho, A. (2010). Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com agroquímicos utilizados no manejo integrado da cultura da cana-de-açúcar. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- Bouchard, M.F.; Bellinger, D.C.; Wright, R.O.; Weisskopf, M.G. (2010). Attentiondeficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. **Pediatrics**. 125: 1270-1277.
- Bradford, M.M. (1967). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254.
- Brehélin, M.; Zachary, D. (1986). Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: Brehelin, M. (Ed.), **Immunity in Invertebrates**. Springer Verlag. Berlin. pp. 36–48.
- Broderick, N.A.; Raffa, K.F.; Handelsman, J. (2010). Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. **BMC Microbiology**. 10: 129.
- Buchon, N.; Silverman, N.; Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to wholeorganism physiology. **Nature Reviews Immunology**. 14: 796–810.
- Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.; Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects, structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**. 23: 329-344.

- Butt, T.M. & Shields, K.S. (1996). The structure and behaviour of Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 68:1-14.
- Caceres, L.; Necakov, A. S.; Schwartz, C.; Kimber, S.; Roberts, I. J. H.; Krause, H. M. (2011). Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. **Genes and Development**. 25: 1476–1485.
- Cessa, R.M.A.; Melo, E.P.; Junior, I.S.L. (2013). Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: noctuidae) alimentadas com folhas de milho e feijoeiro imersas em soluções contendo inseticidas. **Revista Agrogeoambiental**. 5: 85-92.
- Chain, B.M.; Anderson, R.S. (1982). Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. **Journal of Insect Physiology**. 28: 377–384.
- Chen, X., Yang, X., Senthil Kumar, N., Tang, B., Sun, X., Qiu, X., Hu, J., Zhang, W. (2007). The class A chitin synthase gene of *Spodoptera exigua*: molecular cloning and expression patterns. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 37: 409-417.
- Christophides, G.K.; Vlachou, D.; Kafatos, F.C. (2004). Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Immunological Reviews**. 198: 127–148.
- Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**. 57: 946- 950.
- Contardo-Jara, V.; Klingelmann, E.; Wiegand, C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**. 157: 57—63.
- Correia, F.V.; Moreira, J.C.; Nascimento, C.R.; Barreto, E.O. (2015). Glifosato, Superplantas e Subminhocas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**. 6:323-332.
- Costa, E. A. D, Matallo, M.B., Almeida, J. E. M., Loureiro, E. S., Sano, A. H. (2004). Efeito de herbicidas utilizados em cana- de- açúcar no desenvolvimento in vitro do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. 14: 19-24.
- Costa, A.M.; Martins, P.C.C. (2009). Análise da contagem total de hemócitos e capacidade coagulante da hemolinfa do camarão *Litopenaeus Vannamei* (BOONE,1931) em cultivos com ocorrência de necrose muscular. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo. 35(4): 545- 551, 2009
- Cutler, G.C.; Scott-Dupree, C.D.; Tolman, J.H.; Harris, C. R. (2005). Acute and sublethal toxicity of novaluron, a novel chitin synthesis inhibitor, to *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pest Management Science**. 61:1060–1068.

- Dallegrave, E. (2006). **Toxicologia Clínica: Aspectos Teórico-Práticos**. Porto Alegre: UFRGS. 44 – 61.
- De Aguiar, L.M.; Figueira, F.H.; Gottschalk, M.S.; da Rosa, C.E. (2016). Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 185: 94-101.
- De Azambuja, P.; Garcia, E.S.; Ratcliffe, N.A.; Warthen, J.R.J.D. (1991). Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. **Journal of Insect Physiology**. 37 (10): 771–777.
- De Negreiro, M.C.; Carvalho, R.B.; De Andrade, F.G.D.; Levy, S.M.; Moscardi, F.; Falleiros, Â. M. (2009). Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. **Iheringia. Série Zoologia**. 99: 66-70.
- Dutra, K.R.; Pessoa, L.G.A.; Loureiro, E.S.; Junior, R.J.T.; Carniel, A.S.; Cruz, P.M.D.; Ribeiro, M.P. (2013). Compatibilidade de herbicidas utilizados na cultura da soja com o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*. **Disponível (online)**: <<http://seb.org.br/cd/trabalhos/poster/ento/ENTO67.pdf>>. (17 de nov. de 2017
- El-Aziz, N.M.A.; Awad, H.H. (2010). Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. **Micron**. 41(3): 203-209.
- El-Shenawy, N.S. (2009). Oxidative stress responses of rats exposed to roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology Pharmacology**. 28: 379–385.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2014). A importância do manejo integrado na Agrishow. **Disponível (online)**: <<https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/1671932/embrapa-mostra-a-importancia-do-manejo-integrado-de-pragas-na-agrishow>>. (24 de jun. 2016).
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2016a). Soja na alimentação. **Disponível (online)**: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/soja-na-alimentacao>>. (24 de jun. 2016).
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2016b). Cultivares de soja e novas tecnologias da Embrapa chamam atenção de produtores de RO. **Disponível (online)**: <<https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/10844109/cultivares-de-soja-e-novas-tecnologias-da-embrapa-chamam-a-atencao-de-produtores-de-ro>>. (14 de jun. 2016).
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2016c). Soja transgênica. **Disponível (online)**: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-transgenica>>. (12 de jun. 2016).

- EPA – Agência de Proteção Ambiental. (2001). Pesticide fact sheet – novaluron. **Disponível (online):** <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-124002_24-Sep-01.pdf>. (02 de jul. 2016).
- EPA – Agência de Proteção Ambiental. (2013). Novaluron; Pesticide Tolerances. **Federal Register**. 128: 40027-40028.
- Ericsson, J.D.; Janmaat, A.F.; Lowenberger, C.; Myers, J.H.; (2009). Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*. **Jornal of Invertebrate Pathology**. 100 (2): 61–67.
- Erthal Júnior, M. (2011). Controle Biológico de Pragas. I Seminário Mosaico Ambiental: olhares sobre o ambiente. **Anais**. Campos dos Goytacazes/RJ.
- Falleiros, A.M.F.; Bombonato, M.T.S.; Gregório, E.A. (2003). Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 46: 287-294.
- Faraldo, A.C.; Sá-Nunes, A.; Del Bel, E.A.; Faccioli, L.H.; Lello, E. (2005). Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Nitric Oxide**. 13: 240–246.
- Ferment, G.; Zanoni, M.; Nodari, R.O. (2010). Estudo de caso: Sojas convencionais e transgênicas no planalto do Rio Grande do Sul. Ministério do Desenvolvimento Agrário, Brasília. **Disponível (online):** <http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/pageflip-4204229-576-lt_Estudo_de_Caso_Sojas_-1927085.pdf>. (22 jun. 2016).
- Ferreira, L.C.F. (2009). Avaliação do efeito de novaluron, um inibidor da síntese de quitina, sobre a formação de larvas de *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762). Rio de Janeiro: IOC-Fiocruz. 2009. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Instituto Oswaldo Cruz.
- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. (1997). Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 4: 61-68.
- FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. (2017). Informativo DEAGRO (Departamento do Agronegócio)/Safrá Mundial da Soja 2017/2018 – 5º Levantamento USDA Setembro/ 2016. **Disponível (online):** <[file:///C:/Users/Cliente/Downloads/boletim_soja_setembro2017%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Cliente/Downloads/boletim_soja_setembro2017%20(2).pdf)>. (17 set. 2017)
- Foley, E.; O'Farrell, P H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. **Genes and Development**. 17: 115–125.
- Franco, R.; Sánchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E.M.; Panayiotidis, I. (2009). Minireview: Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation research**. 674: 3-22.

- Fregonesi, A. F.; Mochi, D.A.; Monteiro, A.C. (2016). Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**. 83: 01-08.
- Fronza, E.; Specht, A.; Heinzen, H.; de Barros, N.M. (2017). *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* as biological control agent. **Biocontrol Science and Technology**. 27: 1243-1264.
- Gapp, K.; Woldemichael, B.T.; Bohacek, J.; Mansuy, I.M. (2014). Epigenetic regulation in neurodevelopment and neurodegenerative diseases. **Neuroscience**. 264:99-111.
- Gasnier, C.; Dumont, C.; Benachour, N.; Clair, E.; Chagnonb. M.C.; Séralini, G.E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**. 262: 184-191.
- Gianessi, L.P. (2008). Economic impacts of glyphosate- resistant crops. **Pest Management Science**. 64: 346- 352.
- Gluszczak, L.; Miron, D.S; Crestani, M.; Foncesa, M.B.; Pedron, F.A.; Duarte, M.F.; Vieira, L.P. (2006). Effects of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 65: 237–241.
- Gluszczak, L.; Miron, D.S. ;Moraes, B.S.; Simões, R.R.; Schetinger, M.R.C.C.; Morsch, V.M.; Loro, V.L.; (2007). _Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 146: 519–524.
- Gonçalves, S.M. (1983). Estudo dos elementos figurados da hemolinfa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) nos períodos de pré-pupa, pupa e adulto. **Dissertação (Licenciatura em Ciências Biológicas)**. Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu.
- Gonzalez, E.A.; Garg, A.; Tang, J.; Nazario-Toole, A.E.; Wu, L.P. (2013). A glutamate-dependent redox system in blood cells is integral for phagocytosis in *Drosophila melanogaster*. **Current Biology**. 23: 2319–2324.
- Greene, G.L.; Leppla, N.C.; Dickerson, W.A. (1976). Velvetbean Caterpillar: a rearing produce and artificial médium. **Journal of Economic Entomology**. 69: 487-488.
- Green, L.C.; Tannenbaum, S.R.; Goldman, P. (1981) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**. 212: 56-58.
- Gupta, A.P. (1979). Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques. **Cambridge University Press**. Cambridge. p. 614.
- Grupta, A.P. (1991). **Insect immunocytes and other hemocytes: Roles in cellular and humoral immunity**. In: Immunology of Insects and Other Arthropods. Boca Raton: **CRC Press**. pp. 19-118.

- Gullan, P.J.; Cranston, P.S. (2007). **Os insetos: um resumo de entomologia**. Tradução de Sonia Maria Marques Hoenen. São Paulo. Roca.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press. New York. 963.
- Heras-Mendoza, F.; Casado-Fariñas, I.; Paredes-Gascón, M.; Conde-Salazar, L. (2008). Erythema multiforme-like eruption due to an irritant contact dermatitis from a glyphosate pesticide. **Contact Dermatitis**. 59: 54-56.
- Hietanen, E.; Linnainmaa, K.; Vainio, H. (1983). Effects of Phenoxyherbicides and Glyphosate on the Hepatic and Intestinal Biotransformation Activities in the Rat. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**. 53: 103 – 112.
- Hillyer, J.F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental & Comparative Immunology**. 58: 102–118.
- Hoffmann-Campo, C.B.; de Oliveira, E.B.; Moscardi, F. (1985). Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). *Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E)*. **Disponível (online)**: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/445420/1/Doc1.pdf>> (22 jun. 2016)
- Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. **Nature**. 426: 33–38.
- Hokanson, R.; Fudge, R.; Chowdhary, R.; Busbee, D. (2007). Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. **Human & Experimental Toxicology**. 26: 747-752.
- Hong, Y.; Yang, X.; Yan, G.; Huang, Y.; Zuo, F.; Shen, Y.; Ding, Y.; Cheng, Y. (2017). Effects of glyphosate on immune responses and haemocyte DNA damage of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**. 71: 19-27.
- Horohov, D.W.; Dunn, P.E. (1982). Changes in the circulating haemocyte population on *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**. 40: 327–339.
- Huang, Q.; Zhang, L.; Yang, C.; Yun, X.; He, Y. (2016). The competence of hemocyte immunity in the armyworm *Mythimna separata* larvae to sublethal hexaflumuron exposure. **Pesticide biochemistry and physiology**. 130: 31-38.
- Hughes, A.L. (2012). Evolution of the betaGRP/GNBP/beta-1,3-glucanase family of insects. **Immunogenetics**. 64: 549–558.
- IARC - The International Agency for Research on Cancer. (2016). *Glyphosate monographs*. **Disponível (online)**: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-09.pdf>>. (20 mai. 2016).
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. (2012). Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e afins. **Disponível (online)**:

- <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf>. (25 mai. 2016).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (2017). Previsão da safra de grãos recua 0,5% em agosto, mas mantém recorde. **Disponível (online):** <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16531-previsao-da-safra-de-graos-recua-0-5-em-agosto-mas-mantem-recorde.html>>. (17 out. 2017).
- IMEA – Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária. (2015). Custo de produção de soja 2017/2018. **Disponível (online):** <<http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/31082017145046.pdf>>. (17 de set. 2017).
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. (2017). Como surge o câncer. **Disponível (online):** <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. (27 jun. 2017).
- Ishaaya, I.; Yablonski, S.; Mendelson, Z.; Mansour, Y.; Horowitz, A.R. (1996). Novaluron (MCW-275), a novel benzoylphenyl urea, suppressing developing stages of lepidopteran, whitefly and leafminer pests. **Brighton Crop Protection Conference — Pests Diseases**. 1013–1020.
- Jiang, H.; Vilcinskas, A.; Kanost, M.R. (2010). Immunity in lepidopteran insects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 708: 181–204.
- Kaya, B.; Creus, A.; Yanikoğlu, A.; Cabré, O.; Marcos, R. (2000). Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 36: 40–46.
- Kanost, M.R.; Arrese, E.L.; Cao, X.; Chen, Y.R.; Chellapilla, S.; Goldsmith, M.R.; Grosse-Wilde, E.; Heckel, D.G.; Herndon, N.; Jiang, H.; Papanicolaou, A.; Qu, J.; Soulages, J.L.; Vogel, H.; Walters, J.; Waterhouse, R.M.; Ahn, S.J.; Almeida, F.C.; An, C.; Aqrabi, P.; Bretschneider, A.; Bryant, W.B.; Bucks, S.; Chao, H.; Chevignon, G.; Christen, J.M.; Clarke, D.F.; Dittmer, N.T.; Ferguson, L.C.; Garavelou, S.; Gordon, K.H.; Gunaratna, R.T.; Han, Y.; Hauser, F.; He, Y.; Heidel-Fischer, H.; Hirsh, A.; Hu, Y.; Jiang, H.; Kalra, D.; Kliner, C.; König, C.; Kovar, C.; Kroll, A.R.; Kuwar, S.S.; Lee, S.L.; Lehman, R.; Li, K.; Li, Z.; Liang, H.; Lovelace, S.; Lu, Z.; Mansfield, J.H.; McCulloch, K.J.; Mathew, T.; Morton, B.; Muzny, D.M.; Neunemann, D.; Onger, F.; Pauchet, Y.; Pu, L.L.; Pyrous, I.; Rao, X.J.; Redding, A.; Roesel, C.; Sanchez-Gracia, A.; Schaack, S.; Shukla, A.; Tetreau, G.; Wang, Y.; Xiong, G.H.; Traut, W.; Walsh, T.K.; Worley, K.C.; Wu, D.; Wu, W.; Wu, Y.Q.; Zhang, X.; Zou, Z.; Zucker, H.; Briscoe, A.D.; Burmester, T.; Clem, R.J.; Feyereisen, R.; Grimmelikhuijzen, C.J.; Hamodrakas, S.J.; Hansson, B.S.; Huguet, E.; Jermini, L.S.; Lan, Q.; Lehman, H.K.; Lorenzen, M.; Merzendorfer, H.; Michalopoulos, I.; Morton, D.B.; Muthukrishnan, S.; Oakeshott, J.G.; Palmer, W.; Park, Y.; Passarelli, A.L.; Rozas, J.; Schwartz, L.M.; Smith, W.; Southgate, A.; Vilcinskas, A.; Vogt, R.; Wang, P.; Werren, J.; Yu, X.Q.; Zhou, J.J.; Brown, S.J.; Scherer, S.E.; Richards, S.; Blissard, G.W. (2016). Multifaceted biological insights from a draft genome sequence of the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. **Insect biochemistry and molecular**. 76: 118–147.

- Kim, S.H.; Lee, W.J. (2014). Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut microbiota interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 3: 116.
- Koller, V.J.; Fürhacker, M.; Nersesyan, A.; Mišík, M.; Eisenbauer, M.; Knasmuellers (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Archives Of Toxicology**. 86:805–813.
- Kreutz, L.C.; Barcellos, L.J.; de Faria Valle, S.; de Oliveira Silva, T.; Anziliero, D.; Davi dos Santos, E.; Pivato, M.; Zanatta, R. (2011). Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish and Shellfish Immunology**. 30: 51- 57.
- Kreyci, P.F.; Menten, J.O.M. (2013). Seres indesejáveis. **Cultivar grandes culturas**. 167:3-10.
- Kwon, H.; Bang, K.; Cho, S. (2014). Characterization of the hemocytes in *Larvae brevistarsis seulensis*: involvement of granulocyte mediated phagocytosis. **PloS ONE**. 9: e103620.
- Lacerda, M. C. (2008) – Associação de produtos fitossanitários, cultivares transgênicas de soja tolerantes ao glyphosate e organismos não alvo. **Tese (Doctor Scientiae – Fitotecnia)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- Langiano, V.C.; Martinez, C.B.R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 147: 222—231.
- Larsen, K.; Najle, R.; Lifschitz, A.; Virkel, G. (2012). Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 34: 811–818.
- Lavine, M.D.; Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32: 1295-1309.
- Lee, K.A.; Kim, B.; Bhin, J.; Kim do, H.; You, H.; Kim, E.K.; Kim, S.H.; Ryu, J.H.;Hwang, D.; Lee, W.J. (2015). Bacterial uracil modulates *Drosophila* DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes. **Cell Host & Microbe**. 17: 191–204.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review Entomology**. 42: 525-550.
- Lemaitre, B.; Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**. 25: 697–743.
- Limon-Pacheco, J; Gonsebatt, M.E. (2009). Mini review: The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation research**. 674: 3-22.

- Lioi, M.B.; Scarfi, M.R.; Santoro, A.; Barbieri, R.; Zeni, O.; Salvemini, F.; Di Berardino, D.; Ursini, M.V. (1998). Cytogenetic Damage and Induction of Pro-oxidant State in Human Lymphocyte Exposed in vitro to Glyphosate, Vinclozolin, Atrazine and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 1:39 -46.
- Liu, F.; Huang, H.; Wu, K.; Qiu, Z.; Huang, Y.; Ling, E. (2017). Exploiting Innate Immunity for Biological Pest Control. In: Ligoxygakis, P. (Ed). **Advances in Insect Physiology**. Vol. 52. Cambridge: Academic Press. pp 199-230.
- Lopez-Lastra; C.C., Boucias, D.G. (1994). Studies on the cellular reactions of *S. exigua* larvae infected with the fungus *N. rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 63: 101-102.
- Loureiro, E. S.; Moino Junior, A.; Arnosti, A.; Souza, G.C. (2002) Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemos sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**. 31:263-269.
- Lu, A.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Yang, B.; Wu, K.; Xie, W.; Luan, Y.X.; Ling, E. (2014). Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. **Frontiers in Physiology**. 5: 252.
- Lundgren, J.G.; Gassmann. A.J.; Bernal, J.; Duan, J.J.; Ruberson, J. (2009). Ecological compatibility of GM crops and biological control. **Crop Protection**. 1-14.
- Luz, N.B.; Santos, H.P.; Melo, G.W. (2003). Avaliação da Resposta Espectral de Folhas de Aveia Preta (*Avena Strigosa*) Cultivadas em Diferentes Solos da Serra Gaúcha, com Adição de Cobre e Matéria Orgânica. **ANAIS DO SBSR**, 11, 2003, Belo Horizontes. Resumos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. 2343-2349.
- Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; Ovando, H. G.; Weyers, A.; Ugnia, L. *et al.* (2009). Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology Pharmacology**. 28:37–41.
- Manachini, B.; Arizza, V.; Parrinello, D.; Parrinello, N. (2011). Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 106: 360–365.
- Manzoni, G.C.; Grützmacher, A.D.; Pinheiro Giolo, F.; da Roza Härter, W.; Müller, C. (2006). Selectividade de agrotóxicos usados na produção integrada de maçã para adultos de *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41: 1461– 1467.
- Matozzo, V.; Fabrello, J.; Masiero, L.; Ferraccioli, F.; Finos, L.; Pastore, P.; Di Gangi, I.M.; Bogialli, S. (2018). Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**. 233: 623- 632.
- Mead, G.P.; Ratcliffe, N.A.; Renwranzt, L.R. (1986). The separation of insect haemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. **Journal of Insect Physiology**, 32: 167-177.

- Menezes, C.C.; Da Fonseca, M.B.; Loro, V.L.; Santi, A.; Cattaneo, R.; Clasen, B.; Toni, C.; Morsch, V. M. (2011). Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of environmental contamination and toxicology**. 60: 665-671.
- Merzendorfer, H. ; Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**. 206: 4393-4412.
- MMA - Ministério da Agricultura. (2016). Soja. **Disponível (online):** <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. (27 de jun. 2016).
- Miranda, A.C.; Moreira, J.C.; Carvalho, R.; Peres, F. (2007). Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**. 12: 7-14.
- Mladinic, M.; Berend, S.; Vrdoljak, A. L.; Kopjar, N.; Radic, B.; Zeljezic, D. (2009). Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 50: 800–807.
- Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R.; (2010). Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**. 81: 781—787.
- Mohamed, A.H. (2011). Sublethal toxicity of Roundup to immunological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* to *Schistosoma mansoni* infection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 74: 754- 760.
- Moino JR., A.; Alves, S.B. (1998). Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 27: 611-619.
- Monserrat, J.M.; Martinez, P.E.; Geracitano, L.A.; Amado, L.L.; Martins, C.M.G.; Pinho, G.L.L.; Chaves, I.S.; Ferreira-Cravo, M.; Lima, J.V.; Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 146: 221–234.
- Moscardi, F.; Bueno, A. F.; Sosa-Gomez, D.R.; Roggia, S; Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A.F.; Corso, I.C.; Yano, S.A.C. 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**, Embrapa, Brasília. 211–334.
- Mottier, A.; Séguin, A.; Devos, A.; Le Pabic, C.; Voiseux, C.; Lebel, J.M.; Serpentine, A.; Fievet, B.; Costil, K. (2015). Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): from molecular to individual levels. **Marine Pollution Bulletin**. 95: 665—677.
- Moussian, B.; Schwarz, H.; Bartoszewski, S.; Nüsslein-Volhard, C. (2005). Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Morphology**. 264: 117-130.

- Nardi, J.B. (2004). Embryonic origins of the two main classes of hemocytes – granular cells and plasmotocytes – in *Manduca sexta*. **Development Genes and Evolution**. 214: 19-28.
- Negreiro, M.C.C.; Andrade, F.G.; Falleiros, A.M.F. (2004). Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**. 25: 293-308.
- Niere, M.; Dettloff, M.M.; Weise, C.; Ziegler, M.; Wiesner, A. (1999). A insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III. **Biochimica Biophysica Acta**. 1433:16-26.
- Nwani, C.D.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Kushwahab, B.; Lakrab, W.S. (2013). DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environmental Toxicology Pharmacology**. 36: 539–547.
- Obe, G.; Pfeiffer, P.; Savage, J.R.K.; Johannes, C.; Goedecke, W.; Jeppesen, P.; Natarajan, A.T.; Martinez-Lopez, W.; Folle, G.A.; Drets, M.E. (2004). Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**. 504: 17-36.
- Odier, F.; Vey, A.; Bureau, J.P. (1992). In vitro effects of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. **Biology of the Cell**. 74:267–271.
- Ojha, A.; Srivastava, N. (2014). In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 761:10-17.
- Onofre, S.B.; Barros, N. M.; Azevedo, J. L. (2004). Atividade mutagênica de um oligopeptídeo produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**. 8: 7-10.
- Orozco-Flores, A.A.; Valadez-Lira, J. A.; Oppert, B.; Gomez-Flores, R.; Tamez-Guerra, R.; Rodríguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, P. (2017). Regulation by gut bacteria of immune response, *Bacillus thuringiensis* susceptibility and hemolysin expression in *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Physiology**. 98: 275-283.
- Ouda, S. M. (2014). Biological control by microorganisms and ionizing radiation. **International Journal of Advanced Research**. 2: 314-356.
- Paz-Y-Miño, C.; Sánchez, M.E.; Arévalo, M.; Muñoz, M.J.; Witte, T.; De-La-Carrera, G. O. *et al.* (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. **Genetics and Molecular Biology**. 30: 456–460.
- Palmer, W.J.; Jiggins, F.M. (2015). Comparative genomics reveals the origins and diversity of arthropod immune systems. **Molecular Biology and Evolution**. 32: 2111– 2129.
- Parry, H.E.; Pipe, R.K. (2004). Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). **Aquatic Toxicology**. 69: 311- 325.

- Peixoto, F. (2005). Comparative effects of the roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**. 61: 1115—1122.
- Peluso, M.; Munnia, A.; Bolognesi, C.; Parodi, S. (1998). Detection of DNA Adducts in Mice Treated with the Herbicide Roundup. **Environmental Molecular. Mutagenesis**. 31: 55-59.
- Penagos, H.; Ruepert, C.; Partanen, T.; Wesseling, C. (2004). Pesticide patch test series for the assessment of allergic contact dermatitis among banana plantation workers in Panama. **Dermatitis**. 15: 137-145.
- Pereira, B.C.; Pereira, A.K.F.T.C. (2011). **Posturoterapia e Oxigenoterapia Aplicadas DTMs Multifatoriais**. Curitiba: Edição por Demanda.
- Peres, F.; Moreira, J.C. (2007). Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. 23: S612-S621.
- Perveen, N.; Ahmad, M. (2017). Toxicity of some insecticides to the haemocytes of giant honeybee, *Apis dorsata* F. under laboratory conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 1016–1022.
- Peter, A.J.; Ananthakrishnan, T.N. (1995). Impact of azadirachtin on the haemody-namics of *Cyrtacanthacris tatarica* L.(Acrididae:Oryhoptera). **Journal of Entomology Research**. 19: 285–290.
- Pipe, R.K.; Coles, J.A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish and Shellfish Immunology**. 5: 581– 595.
- Poletta, G.L.; Larriera, A. Kleinsorge, E.; Mudry. M.D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. **Mutation Research**. 672: 95-102.
- Ratcliffe, N.A.; Rowley, A.F.; Fitzgerald, S.W.; Rhodes, C.P. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**. New York. 97: 183-279.
- Relyea, R.A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological Applications**. 15 (4): 1118—1124.
- Reynolds, S. E.; Samuels, R. I. (1996). Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. **Advances In Insect Physiology**. 26: 157-232.
- Rezende, G.L.; Martins, A.J.; Gentile, C.; Farnesi, L.C.; Pelajo-Machado, M.; Peixoto, A.A.; Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. **BMC Developmental Biology**. 8:82.
- Russo, J. M.; Brehélin & Y. Carton. (2001). Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**. 47: 167-172.

- Sagiv, S.K.; Thurston, S.W.; Bellinger, D.C.; Tolbert, P.E.; Altshul, L. M.; Korrick, S.A. (2010). Prenatal organochlorine exposure and behaviors associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-aged children. **American Journal Epidemiology**. 171: 593-601.
- Samsel, A., Seneff, S. (2013). "Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases" **Entropy**. 15: 1416-1463.
- Sanjayan, K.P.; Ravikumar, T.; Albert, S.; (1996). Changes in the haemocyte profile of *Spilostethus hospes* (Fab.) (Heteroptera: Lygaeidae) in relation to eclosion, sex and mating. **Jornal of Biosciences**. 21 (6): 781–788.
- Santos, O.S. Dos; Alvarez Filho, A., Saccol, A.V.; Heldwein, A.B.; Dalmeyer, A.U.; Link, D.; Costa, E.C; Scheider, F.M.; Buriol, G.A; Còvol, G.; Kaminski, J.; Fries, M.R.; Menezes, N. L.; Manara, N.T.F; Manfron, P.A.; Veiga, P.; Machado, S.L.O.; Sedyama, T.; Boller, W. (1995). **A cultura da soja, 1: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná**. 2ed. Globo: São Paulo. 299.
- Sass, M.; Kiss, A.; Locke, M. (1994). Integument and hemocyte peptides. **Journal of Insect Physiology**. 40:407-421.
- Sharma, P.R.; Sharma, O.P.; Saxena, B.P. (2003). Effect of Neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera; Noctuidae). **Current Science**, 84: 690-695.
- Sharma, P.R.; Sharma, O.P.; Saxena, B.P. (2008). Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Micron**. 39: 544-551.
- Schneider, M.I., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H. Ronco, A. (2009). Impacto of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. **Chemosphere**. 76: 1451- 1455.
- Schlesinger, S. (2004). A soja no Brasil. Brasil Sustentável e Democrático. Seminário do Cone sul. **Disponível (online)**: <<http://uma.terra.free.fr/2Agrobusiness/Soja-Brasil.rtf>>. (01 jul. 2015).
- Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**. 50: 529-551.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**. 215: 213–219.
- Silva, C.C. (2002) Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 24: 68-72.
- Silva, A.C.; Lima, E.P.C; Batista, H.R. (2011) A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. In: Encontro De Economia Catarinense, Florianópolis. **Anais...** Criciúma.

- Silva, W.C.; Ribeiro, J.D; Souza, H. E. M. S.; Corrêa; R.S. (2007). Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica** 37: 293-298.
- Silva, J.J.; Mendes, J. (2002). Effect of Diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 97(5): 679-682.
- Silveira, E.B.; Ribeiro, B.M.; Bão, S.N. (2003). Characterization of larval haemocytes from the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of submicroscopic cytology and pathology**. 35(2):129-39.
- Simonato, J.; Grigolli, J.F.J.; Oliveira, H. N. (2014) Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja. In: LOURENÇÃO, A.L.F.; GRIGOLLI, J.F.J.; MELOTTO, A.M.; PITOL, C.; GITTI, D.C.; ROSCOE, R. (Org.). Tecnologia e Produção Soja 2013/2014. 1ed .Curitiba: Midiograf, 2014:178-193. **Disponível (online):** <http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/138/138/55ad4e4992ae435323cb62f8c93a59f6741147100fa0c_08-controle-biologico-de-insetos-praga-na-soja.pdf>. (02 jul. 2015).
- Sinhorin, V.D.G.; Sinhorin, A.P.; Teixeira, J.M.S.; Miléski, K.M.L.; Hansen, P.C.; Moreira, P.S.A.; Kawashita, N.H.; Baviera, A.M.; Loro, V.L. (2014). Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). **Ecotoxicology Environmental Safety**. 106: 181–187.
- Sobral, J.K. (2003). A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endofíticos- planta. **Tese**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo.
- Sohn, H. (2014). Ação, controle e regulação de agrotóxicos e biocidas. **Disponível (online):** <<http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80104/SEMINARIOS%20E%20WORKSHOPS/Dialogos%20Setoriais%20-%20Controle%20e%20Regulacao%20de%20Agrotoxicos/Livro%20Diagramado.pdf>>. (01 jul. 2016).
- Sosa-Gómez, D.R. (2005). Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. **Embrapa Soja**. Londrina,PR.
- Stephenson, G.R.; Ferris, I.G.; Hollnad, P.T.; Nordberg, M. (2006). Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**. 78: 2075-2154.
- Strand, M.R.; (2008). The insect cellular immune response. **Insect Science**. 15: 1–14.
- Tanaka, H.; Yamakawa, M. (2011). Regulation of the innate immune responses in the silkworm, *Bombyx mori*. **Invertebrate Survival Journal**. 8: 59-69.

- Tanzini, M.R.; Alves, S.B.; Stten, A. (2002). Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomopatogênicos. **Arquivo Instituto Biológico** 69: 65-69.
- Tellam, R. L.; Vuocolo, T.; Johnson, S. E.; Jarmey, J.; Pearson, R. D. (2000) Insect Chitin Synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. **European Journal of Biochemistry**. 267: 6025-6042.
- Triplehorn, C.A.; Johnson, N.F. (2011) **Estudo dos Insetos**. Tradução de All Tasks. São Paulo: Cengage Learning.
- Tunaz H.; Uygün N. (2004) Insect growth regulators for insect pest control. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 28: 377-387.
- USDA. United States Department of Agriculture (2015). World Agricultural Production. **Disponível (online):** <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. (09 jul. 2015).
- Van Lenteren, J.C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **Bio Control**. 57: 1-20.
- Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Benfato, M. S.; Manfredini, V.; Kubota, L. T. (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. 1323–1338.
- Vilmos P.; Kurucz, E. (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters**. 62: 59–66.
- Wang, L.; Ligoxygakis, P. (2006). Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. **Immunobiology** 211: 251–261.
- Wang, C.; St Leger, R.J. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A. 103: 6647–6652.
- White, P.A.; Rasmussen, J.B. (1998) The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutation Research**. 410: 223-236.
- WHO - World Health Organization. (2003). Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides: Novaluron. Genebra. **Disponível (online):** <http://www.who.int/whopes/quality/en/Novaluron_evaluation_Dec_2004.pdf>. (23 jun. 2015).
- WHO – World Health Organization. (2011). Guidelines for Drinking-water Quality. **Disponível (online):** <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf>. (01 jul. 2016).
- Wills, E.D. (1966) Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. **Biochemical Journal**, 99: 667–676.

- Wynder, C.; Stalker, L.; Doughty, M. L. (2010) Role of H3K4 demethylases in complex neuro developmental diseases. **Epigenomics**. 2:407-18.
- Yamada, T.; Castro, P.R.C. (2007) Efeito do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. Encarte técnico. **Informações Agronômicas**. 119:32.
- Yamanaka, N.; O'Connor, M.B. (2011). Nitric oxide directly regulates gene expression during *Drosophila* development: Need some gas to drive into metamorphosis. **Genes and Development**. 25: 1459–1463.
- Yamashita, M.; Iwabuchi, K. (2001) *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**. 47: 325-331.
- Yasmin, S.; D'Souza, D. (2007). Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 79: 529–532.
- Yaroslavtseva, O.N.; Dubovskiy, I.M.; Khodyrev, V.P.; Duisembekov, B.A.; Kryukov, V. Y.; Glupov, V.V. (2017). Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae. **Journal of Insect Physiology**. 96: 14-20.
- Ye, M.Z.; Han, G.Y.; Fu, C.L.; Bao, J.R. (1993) Insecticidal toxin produced by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. **Acta Agriculturae Universitatis Zheijangesis**. 19: 76-79.
- Zhang, L.; Lu, Z. (2015). Expression, purification and characterization of an atypical 2-Cys peroxiredoxin from the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Molecular Biology**. 24: 203–212.
- Zimoch, L.; Merzendorfer, H. (2002) Immuno localization of chitin synthase in the tobacco hornworm. **Cell Tissue Research**. 308: 287-297.