



**Universidade Federal de São Carlos**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Curso de Engenharia Agrônoma**



**MARÍLIA DE AQUINO E SAGLIETTI LEMES**

**ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EM DIETA ARTIFICIAL PARA CRIAÇÃO  
DE *Diatraea saccharalis* VISANDO O CONTROLE DE  
PROTOZOÁRIOS**

**ARARAS - 2022**



**Universidade Federal de São Carlos**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**Curso de Engenharia Agrônoma**



**MARÍLIA DE AQUINO E SAGLIETTI LEMES**

**ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EM DIETA ARTIFICIAL PARA CRIAÇÃO  
DE *Diatraea saccharalis* VISANDO O CONTROLE DE  
PROTOZOÁRIOS**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para a obtenção do título de Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete Silva de Campos.

**ARARAS – 2022**

**Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por todos os momentos da minha existência.

Aos meus pais, Adriana e Renato Lemes, por sempre acreditarem no meu potencial e por me terem me dado todo o apoio, incentivo e bons conselhos durante a graduação.

A todos os funcionários do Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal, especialmente a Técnica de Laboratório Regina pelo auxílio na pesquisa.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete Silva de Campos, pela sua dedicação como orientadora, pela disposição, tempo e principalmente por todo conhecimento passado durante minha jornada acadêmica, agradeço de coração.

As minhas irmãs da República Gaia, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha graduação, que fizeram ser possível eu chegar onde estou. Muito obrigada por me mostrarem o que é morar em república e obter todo amor, companheirismo e principalmente crescimento pessoal, serei eternamente grata a vocês.

Por fim, agradeço a UFSCar, campus Araras, a todos os professores, direção, administração, técnicos e funcionários de serviços gerais e do RU, os quais me proporcionaram toda estrutura e conhecimento necessário para que eu chegasse até aqui, vocês foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional, o meu muito obrigada.

“Não importa que você vá devagar, contanto que você não pare.”

**Confúcio**

## RESUMO

O controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) pelo parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) é o mais empregado e o de maior importância no Brasil. Entretanto, a ocorrência de protozoários, microsporídeo do gênero *Nosema*, tem sido um dos fatores que mais limitam a produção massal de *Diatraea saccharalis* nos laboratórios de produção de *Cotesia flavipes* em programas de controle biológico de cana-de-açúcar, devido a facilidade de transmissão deste microsporídeo de geração para geração no hospedeiro, as dificuldades de controle por falta de antibióticos específicos, e a identificação de indivíduos com baixo nível de infecção, permite que o agente patogênico mantenha-se de forma endêmica na criação, comprometendo a produção do parasitoide. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de dois antibióticos no controle desse protozoário que se desenvolve na dieta de criações de *D. saccharalis*. Os tratamentos utilizados foram Annita® (nitazoxonida D1-500mg +dieta; nitazoxonida D2 250mg + dieta) e Flagyl® (metronidazol D1-400mg + dieta; metronidazol D2-200mg + dieta), comparados com a Testemunha (dieta padrão). Os resultados mostraram que dos antibióticos testados, Annita® (nitazoxanida) e Flagyl® (metronidazol) nas dosagens (D1 e D ½), controlaram os protozoários e desde que associados a uma rigorosa seleção de lagartas, pupas e adultos, com sintomas de infecção por microsporídeos, obtêm-se bons índices de eficiência na produção.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp; microsporídeos; criação artificial; controle biológico.

## ABSTRACT

### **ANTIBIOTICS USED IN ARTIFICIAL DIET TO CREATE *Diatraea saccharalis* AIMING TO CONTROL PROTOZOA**

The biological control of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) is the most used and the most important in Brazil. However, the occurrence of protozoa, microsporidia of the genus *Nosema*, has been one of the factors that most limit mass production of *Diatraea saccharalis* in laboratories for the production of *Cotesia flavipes* in sugarcane biological programs, due to the ease of transmission of this microsporid from generation to generation in the host, the difficulties of control due to the lack of specific antibiotics, and the identification of individuals with a low level of infection, allows the pathogenic agent to remain endemic in the creation, compromising parasitoid production. The objective of this work was to test the effect of two antibiotics in the control of this protozoan that develops in the diet of *D. saccharalis* creations. The treatments used were Annita® (nitazoxonida D1- 500mg + diet; nitazoxonida D2 - 250mg + diet) e Flagyl® (metronidazol D1- 400mg + diet; metronidazol D2 - 200mg + diet), compared with the Control (standard diet). The results showed that of the antibiotics tested, Annita® (nitazoxanide) and Flagyl® (metronidazole) at dosages (D1 and D ½), controlled protozoa and provided that they were associated with a rigorous selection of caterpillars, pupae and adults with symptoms of infection. by microsporidia, good indices of production efficiency are obtained.

**Keyword:** *Saccharum* spp.; microsporidia; artificial creation; biological control.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Frasco de vidro transparente contendo dieta. Araras – SP, 2020.....	24
<b>Figura 2:</b> Câmaras de acasalamento para obtenção dos ovos de <i>D. saccharalis</i> . Araras – SP, 2020.....	24
<b>Figura 3:</b> Frascos com os diferentes tratamentos contendo dieta e ovos para o desenvolvimento de lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Araras – SP, 2020.....	25
<b>Figura 4:</b> Seleção de lagartas de <i>D. saccharalis</i> aptas “viáveis” e não aptas “não viáveis”. Araras – SP, 2020.....	25
<b>Figura 5:</b> Lagartas de <i>D. saccharalis</i> sadias “aptas” e realimentadas de acordo com os tratamentos propostos. Araras-SP, 2020.....	26
<b>Figura 6:</b> Pupas perfeitas e imperfeitas de <i>D. saccharalis</i> selecionadas de acordo com os tratamentos. Araras-SP, 2020.....	26
<b>Figura 7:</b> Lagartas aptas de <i>D. saccharalis</i> , por tratamento. Araras-SP, 2020.....	28
<b>Figura 8:</b> Pupas perfeitas de <i>D. saccharalis</i> por tratamentos. Araras-SP, 2020.....	30
<b>Figura 9:</b> Adultos perfeitos de <i>D. saccharalis</i> por tratamento. Araras-SP, 2020.....	31

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tratamentos e dosagens dos antibióticos testados, Araras – SP, 2020.....22
- Tabela 2.** Dieta artificial para criação de *D. saccharalis* (Hensley e Hammond, 1968, modificada por Macedo, 2000). Araras - SP, 2020.....**Erro! Indicador não definido.**3
- Tabela 3.** Número de lagartas de *D. saccharalis*, aptas e não aptas e respectivas porcentagens e índice de eficiência. Araras - SP, 2020.....27
- Tabela 4.** Número de pupas de *D. saccharalis*, perfeitas e imperfeitas e respectivas porcentagens e índices de eficiência. Araras - SP, 2020.....29
- Tabela 5.** Número de adultos de *D. saccharalis*, perfeitos e imperfeitos e respectivas porcentagens e índices de eficiência. Araras - SP, 2020.....31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR ( <i>Saccharum officinarum</i> ) .....	<b>11</b>
2.2 PRODUÇÃO MASSAL DE INIMIGOS NATURAIS.....	<b>12</b>
2.3 BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR ( <i>Diatraea saccharalis</i> ) .....	<b>12</b>
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DA BROCA ATRAVÉS DO PARASITÓIDE <i>Cotesia flavipes</i> .....	<b>14</b>
2.5 PROTOZOÁRIOS (Microsporídeo <i>Nosema</i> ) EM CRIAÇÕES MASSAIS DE <i>Diatraea saccharalis</i> .....	<b>16</b>
2.6 ANTICONTAMINANTES NO CONTROLE DE PROTOZOÁRIOS (Microsporídeo <i>Nosema</i> ) .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral.....	<b>21</b>
2.2 Objetivos específicos.....	<b>21</b>
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>
<b>7. ANEXO A</b> .....	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, responsável pela produção de 654,5 milhões de toneladas na safra 2021/22, tornando a cana de extrema importância para a economia nacional (CONAB, 2022).

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), é uma das principais pragas que atingem a cana. Ela exibe um hábito alimentar que causa danos na planta, o que gera perdas significativas de produtividade. (GALLO et al, 2002)

Para o controle dessa praga, é majoritariamente utilizado o parasitoide *Cotesia flavipes*, criado de forma massal em laboratórios e que só apresenta um ciclo completo quando associado a *Diatraea saccharalis* (PINTO et al. 2006).

Para Botelho (1992), ficou claro após anos de estudo, que um dos entraves para o controle da broca era o domínio de sua criação, e que era necessário aperfeiçoar as técnicas utilizadas para atingir o objetivo de manter uma criação massal de lagartas.

Quando a criação de insetos é feita de forma massal em laboratórios, a dispersão de contaminantes ocorre de forma muito facilitada entre as populações. Para Macedo (2000), os protozoários se tornaram contaminantes muito frequentes em criações de *D. saccharalis*, sendo os de maiores relevância os microsporídeos do gênero *Nosema*.

Geralmente os microsporídeos ocasionam sintomas que podem ser descritos por uma debilidade geral do inseto, podendo vir a causar a morte do mesmo devido a mau funcionamento, destruição de órgãos internos ou pela privação de suas reservas essenciais, ocasionando uma debilidade de forma lenta da população (Alves, 2008).

Uma dieta artificial utilizada na criação massal de *D. saccharalis* precisa conter anticontaminantes para obter sucesso na criação de lagartas saudáveis, o uso de antibióticos pode ser feito para se obter o controle dos microsporídios nas populações (ALVES, MOINO, 1998).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

A cana-de-açúcar é uma gramínea de clima tropical, economicamente importante para o homem, foi à primeira cultura introduzida no Brasil, sendo cultivada a quatro séculos no litoral do Nordeste, e graças à produção de álcool etílico e açúcar, disseminou-se por quase todos estados brasileiros, estabelecendo-se nos mais diferentes tipos de solos. Tem sido cultivada em regiões de clima quente com solos férteis e bem drenados, adaptando-se as características climáticas exigentes pela cultura (MATZUOKA, 1996; CESNIK; MIOCQUE,2004).

É uma planta da família Poaceae e do Gênero *Saccharum*, formando inflorescência (espiga); é uma planta ereta, perene, rizomatosa, e também forma touceiras, o crescimento do caule se dá em colmos, e as folhas possuem lâminas de sílica em suas bordas. Ela abrange pelo menos cinco espécies (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis*, *S. barberi*, *S. robustum*), sendo que as variedades comercializadas são híbridos do gênero *Saccharum* denominadas de *Saccharum spp* (MATZUOKA, 1996; MOZAMBIONI et al., 2006).

Originária da Ásia Meridional e bastante cultivada em países tropicais e subtropicais, figurando entre os maiores produtores o Brasil, a Índia, a China, entre outros países (ROS, 2004). Seu cultivo no Brasil teve início em 1522, na cidade de São Vicente, tendo sido trazida da Ilha da Madeira por Martim Afonso de Sá. Em 1533, foi introduzida em Pernambuco por Duarte Coelho Pereira (BASTOS, 1987).

A importância da cultura teve início a partir de 1970 com o incentivo do governo federal para as agroindústrias canavieiras na tentativa de solucionar a crise energética emergente, frente à potencialidade da cana-de-açúcar como fonte renovável. Os principais produtos gerados a partir da cana-de-açúcar são o açúcar e o etanol, sendo o país considerado o primeiro no mundo na produção destes fatores e com perspectivas de conquistar cada vez mais o mercado externo por meio do biocombustível como alternativa energética, intensificando a busca por formas de energia limpa (renovável), que possa substituir fontes não renováveis como o petróleo (OLIVEIRA et al., 2001; WEINER; CLINGAN, 2012; MORAIS et al., 2015).

A área de cana-de-açúcar destinada ao setor sucroalcooleiro na safra 2021/2022, foi estimada em 8,3 milhões hectares, e responsável pela produção de 654,5 milhões de toneladas destinados à produção de 41,2 milhões de toneladas de açúcar e 29,7 bilhões de litros de etanol (CONAB,2022).

Devido à importância que apresenta na economia nacional e as grandes perspectivas futuras para o setor, o ataque de pragas e doenças tem sido uma das principais causas de queda de produtividade, menor longevidade de canaviais e redução da qualidade de colmos, destacando-se, ainda, que o intenso ataque de pragas induz a inversão da sacarose, provocando uma queda de rendimento industrial, causando, assim, um alto prejuízo econômico (RENZI et al. 2019).

Em uma estimativa feita por Arrigoni (2018), é possível constatar que o prejuízo econômico causado por pragas na produção de cana-de-açúcar pode girar em torno de 9,4 bilhões de reais por ano, o que destaca a importância do adequado controle de pragas na cultura.

Dentre as pragas existentes, uma das mais importantes que atacam a cultura é a broca da cana *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), cujos danos são responsáveis por relevantes perdas na produção de açúcar e álcool (PRECETTI et al. 1988; DINARDO-MIRANDA et al. 2008).

## **2.2 PRODUÇÃO MASSAL DE INIMIGOS NATURAIS**

Para a produção massal do parasitoide “vespinha” *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) no laboratório, com vistas ao controle biológico, é necessário à criação da broca-da-cana o hospedeiro *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

## **2.3 BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Diatraea saccharalis*)**

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera-Cambridae) é uma das principais pragas da cana-de-açúcar e está presente em todas as regiões de cultivo da cana (GALLO et al., 2002).

O aumento da infestação ocorre devido a fatores climáticos, grandes áreas de expansão, plantio de variedades susceptíveis, aumento das áreas fertirrigadas e pela redução no controle biológico com o uso de *Cotesia flavipes* (GARCIA; BOTELHO, 2016).

É considerada uma praga polífaga, que ataca diversas culturas além da cana, tais como o milho, sorgo e outras poáceas, sendo capaz de causar enormes prejuízos. Tem como provável centro de origem a América Central e do Sul (MENDES et al., 2012).

É uma mariposa pequena de  $\pm 2,5$  cm de tamanho de coloração amarelo-palha, a fêmea maior que macho e com abdome volumoso, com as asas menos pigmentadas que o macho. O período de vida do adulto é em média de 5 dias, a fêmea atrai o macho para a cópula, pela liberação de feromônio, e após o acasalamento depositam cerca de 300 ovos. A postura é feita em massa, colocando de 5 a 50 ovos. Quatro a nove dias após a postura, os ovos que foram fecundados eclodem as lagartas que inicialmente se alimentam do parênquima foliar no interior da bainha da folha. Com a primeira ecdise, perfuram a parte mais mole do colmo abrindo galerias de baixo para cima. No final do ciclo larval, as lagartas abrem um orifício no colmo da cana, fechando-o com fios de seda e restos de alimentos. Esse orifício serve como abrigo para o nascimento da mariposa que ocorre de 7 a 14 dias após a transformação da lagarta em crisálida (BOTELHO; MACEDO, 2002; SILVA, 2004; MACEDO et al., 2012; GARCIA; BOTELHO, 2016).

Ela apresenta um ciclo de 53 a 60 dias, o qual varia de acordo com as condições climáticas a que está sujeita, podendo ter ao longo do ano entre 4 a 5 gerações (NAKANO, 2011).

Logo após a eclosão dos ovos, as lagartas se alimentam do parênquima das folhas inicialmente e acabam penetrando o colmo através da região dorsal da folha junto a bainha. Quando se encontram no interior do colmo, as brocas se alimentam do mesmo. Devido ao seu hábito alimentar que ocasiona galerias no colmo das plantas, a cultura atingida apresenta perdas significativas em qualquer estágio de seu desenvolvimento. Esses danos, dependendo do estágio da planta podem ocasionar desde a perda de peso da cana até em morte da mesma, como é o caso quando ocorre a morte apical da cana-de-açúcar, mais conhecido por coração morto (PÉREZ, K.G., 2013).

Além disso, a praga também pode ocasionar o enraizamento aéreo e formação de brotações laterais. A abertura de galerias pode provocar prejuízos indiretos, pois funcionam como porta de entrada para os fungos (*Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*) que causam a podridão vermelha do colmo.

Com isso, tem-se a inversão da sacarose que diminui a pureza do caldo e o rendimento do açúcar e álcool (GALLO et al., 2002; GARCIA, 2013).

No estado de São Paulo a cana-de-ano-e-meio que é plantada no início do ano, é mais atacada pela broca no verão e a cana-de-ano (plantada em setembro-outubro) é mais atacada no inverno. Nos demais estados, dependendo da variedade, o ataque da broca é praticamente constante o ano inteiro, com declínio relativo durante o inverno (PINTO; LOPES; LIMA, 2013).

Estudos mostram que nas variedades antigas, que são mais fibrosas que as atuais, ocorrem prejuízos de 0,77% na produção, redução de 0,25% em açúcar e 0,20% em álcool a cada 1% de intensidade de infestação da broca, ou seja, a cada 100 entrenós examinados, existem um brocado. Nas variedades atuais, as perdas são de 1,14% no peso da cana no campo, 0,42% de açúcar e 0,21% de álcool. Essa redução equivale a 523 gramas de açúcar por tonelada de cana processada (PINTO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2009).

Desta forma, torna-se necessário seu controle, o qual é realizado através da produção massal em laboratório e liberação no campo da vespinha *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) (MACEDO et al., 1983).

## **2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DA BROCA ATRAVÉS DO PARASITÓIDE**

### *Cotesia flavipes*

O sucesso do controle biológico da broca se deve pela existência de grande diversidade de parasitoides e predadores que atuam principalmente nas fases de ovo e de lagarta da praga, como é o caso da vespa originária da região Asiática, a vespinha *C. flavipes* teve suas primeiras tentativas de introdução no Estado de São Paulo pela Esalq/USP e Coopersucar, em 1971 (MENDONÇA et al., 1977).

No estado de São Paulo o programa de controle biológico da broca com *C. flavipes* foi conduzido pelo IAA/Planalsucar desde 1972, com levantamentos de intensidade de infestação da praga e estudos de opções de controle (MACEDO; BOTELHO, 1986).

Em abril de 1974, o parasitoide, proveniente de Trinidad, foi introduzido em Alagoas, com excelentes resultados de parasitismo dando início sua participação no Programa Nacional de Controle Integrado da Broca da Cana-de-açúcar, implantado pelo IAA/Planalsucar (MENDONÇA et al., 1977).

Em relação à produção dos parasitoides, as primeiras pesquisas foram com espécies de *Lixophaga diatraeae*, originária de Cuba e também espécies nativas de *Metagonistylun minense* e *Paratheresia claripalpis*, porém não obtiveram sucesso no controle da broca da cana. Por isso, entre 1976 e 1978 surgiram os primeiros trabalhos com o parasitoide *Cotesia flavipes*, introduzindo em São Paulo com linhagens oriundos do Paquistão e Índia que possui clima parecido com o do estado, o que gerou índices de parasitismo elevados (BOTELHO, 1992).

Segundo Pinto et al. (2006), os estádios de desenvolvimento da *Cotesia flavipes* possuem as fases de larva, pupa e adulto. Como é um parasitoide, a vespa só apresenta o seu ciclo completo quando associadas às lagartas de *Diatraea saccharalis*. O parasitismo tem início com a picada da vespa que consegue depositar diversos ovos no interior da lagarta, em seguida as larvas são eclodidas e se alimentam da lagarta que por consequência são mortas sem conseguir completar o ciclo de vida. Posteriormente, com as larvas bem desenvolvidas, saem do corpo da lagarta transformando-se em pupas revestidas por casulos brancos que unidos formam uma “massa” branca. Com o passar dos dias emergem os adultos, vespinhas pretas pequenas que tendem a se acasalar dando origem a um novo ciclo.

Botelho e Macedo (2002) consideram que desde o início dos estudos com *Cotesia flavipes* até os últimos anos a área plantada de cana-de-açúcar dobrou no estado de São Paulo e ainda houve mudança no perfil das variedades plantadas sendo utilizadas canas ricas em açúcar, mais produtivas e ainda mais suscetíveis à *D. saccharalis*. Com isso, o aumento do parasitismo da vespa gerou uma redução no Índice de Intensidade de Infestação Final (IIF) de 10% para cerca de 2%. Isso representa significativa diminuição das perdas anuais que anteriormente eram de 100 milhões de dólares para 20 milhões de dólares em São Paulo (GARCIA; BOTELHO, 2016).

Esse é um dos mais bem sucedidos programas de controle biológico no mundo e de grande importância para o Brasil, mas algumas criações têm sido afetadas pela presença de protozoários, microsporídeo *Nosema*.

## **2.5 PROTOZOÁRIOS (Microsporídeo *Nosema*) EM CRIAÇÕES MASSAIS DE *Diatraea saccharalis***

Os insetos criados em laboratório são atacados por grupos diversos de microrganismos que inclui vírus, bactérias, rickétsias, fungos e protozoários. Esses patógenos podem ser bem específicos para uma faixa de hospedeiros, como é o caso de alguns baculovírus e microsporídeos. Por outro lado, alguns deles podem infectar grande número de espécies, como certos fungos. Eles podem ser relativamente fáceis de identificar, como os fungos que esporulam na superfície de insetos infectados. A identificação de patógenos intracelulares obrigatórios, como viroses e rickétsias, é frequentemente mais difícil, pois eles não são geralmente cultivados *in vitro* e seus sinais e sintomas não são facilmente interpretados (SOARES Jr., 1992).

Os protozoários de maior relevância em insetos são conhecidos como microsporídeos. São conhecidos como importantes agentes na regulação natural da população de insetos. Os mesmos têm sido isolados de várias espécies de lepidópteras (VAVRA et al, 2006).

Na década de 1970, foi constatada a presença de microsporídeos em criações de broca-da-cana no Brasil causando problemas na criação desse inseto em laboratórios (SIMÕES, 2012).

Os microsporídeos de *D. saccharalis* pertence ao gênero *Nosema* sendo que a espécie ainda não foi descrita e em laboratório, este microsporídeo também é patogênico a sete espécies de lepidópteros de importância agrícola (SIMÕES, 2012).

A grande maioria dos protozoários não possui alta virulência ou ação rápida em seus hospedeiros. Geralmente eles ocasionam sintomas que podem ser descritos por uma debilidade de forma lenta do inseto, que pode vir a causar a morte do inseto devido a mau funcionamento, destruição de órgãos internos ou pela privação de suas reservas essenciais (ALVES, 1986; 2008).

Um dos problemas encontrados na produção massal de insetos hospedeiros que são mantidos em dietas artificiais, são as contaminações muitas vezes, devido ao aumento do número de insetos produzidos. Se as técnicas de assepsia de instalações, equipamentos, recipientes e dietas forem bem empregadas, as condições controladas (temperatura, umidade, luz, aeração) e as medidas básicas de prevenção, o risco de contaminações na

criação será menor. A estratégia para o controle de uma doença numa criação de insetos depende do agente causal, se a doença é infecciosa ou não e se fatores estressores estão ou não envolvidos. (ALVES; MOINO Jr., 1998).

Macedo (2000), afirma que, as contaminações de protozoários vêm sendo mais frequentes e difíceis de controlar nas criações de *D. saccharalis*, pelo fato de que não haver produtos específicos para seu controle e que eles passam de uma geração para outra através da transmissão transovogênica e transovariana. Em quase todas as criações desses insetos em laboratório existe a contaminação por protozoários, os níveis de sintomas que eles causam na população varia de acordo com o nível em que a contaminação se encontra.

A maioria das associações entre protozoários entomógenos e insetos produzem infecções crônicas e subletais, caracterizadas por uma debilitação geral do inseto, matando seus hospedeiros lentamente por mau funcionamento e destruição de órgãos internos ou privando o hospedeiro de suas reservas essenciais (HURD, 1993). Muitas infecções de protozoários exibem sinais inespecíficos e sintomas de doenças, tais como lentidão, crescimento irregular, perda de apetite, mal formação de larvas, pupas e adultos, ou adultos com reduzido vigor, fecundidade e longevidade (SIKOROWSKI; LAWRENCE, 1997).

Os insetos acometidos por microsporídeos geralmente apresentam sintomas visíveis, como corpo distendido, especialmente o abdome, e formação de grumos esbranquiçados ou amarelados facilmente visíveis, dependendo da transparência do tegumento do inseto. Esses grumos são, na realidade, massas de esporos refringentes, isolados ou em grupos, de tamanho e formato homogêneo (CASTELO BRANCO JR., 1998).

Outros sintomas associados a presença de microsporídeos em criações de insetos, é a presença de manchas pretas melanizadas no tegumento, movimentos lentos; perda de locomoção; desenvolvimento anormal; alimentação reduzida, entre outros (PARRA, 2015)

No caso das criações de *D. saccharalis* medidas profiláticas como: eliminação de lagartas com sintomas visíveis a olho nu e eliminação de crisálidas e adultos com sintomas visíveis, embora não elimine 100% do agente patogênico, permite mantê-lo em níveis de controle (MACEDO *et al.*, 2001).

## **2.6 ANTICONTAMINANTES NO CONTROLE DE PROTOZOÁRIOS**

(Microsporídeo *Nosema*)

De acordo com Parra et al. (2009), a utilização de anticontaminantes é de extrema importância para o controle de leveduras, fungos, bactérias, vírus, protozoários, entre outros, pois devido a forma de criação massal, a dispersão desses contaminantes ocorre de forma facilitada entre as populações.

Muitas vezes as populações vindas direto do campo acabam sendo a principal fonte de contaminantes microbianos (VAN LENTEREM, 2000).

De acordo com Alves e Moino Jr. (1998), para o sucesso de uma dieta artificial, é preciso que ela contenha anticontaminantes, sejam eles antibióticos ou substâncias fungistáticas, para evitar ou ao menos reduzir a contaminação por microrganismos. Os anticontaminantes químicos que são mais utilizados nas dietas artificiais de insetos são: formaldeído de 0,03 a 0,3%; metilparahidroxibenzoato (nipagin) de 0,04% a 2%, butil e propilparahidroxibenzoato, hipoclorito de sódio, 0,01%, 0,2% e 1%, ácido propiônico, benzoato de sódio, ácido benzoico, sorbato de potássio, ácido sórbico, de 0,005% a 0,15%, estreptomicina, penicilina e aureomicina (PARRA, 2015).

Segundo Alverson e Cohen (2002), é preciso levar em consideração também o efeito dos anticontaminantes na saúde e no desenvolvimento dos insetos e não só na supressão da contaminação, a sua eficácia não deve analisar um critério isoladamente.

Singh e House (1970) realizaram estudos afim de observar os efeitos prejudiciais que os anticontaminantes utilizados nas dietas artificiais tem sobre os insetos e verificaram que pode haver um prolongamento do período larval, aumento da mortalidade nas fases larval e pupal e uma inibição do desenvolvimento. Portanto na avaliação de dietas artificiais e suas concentrações de anticontaminantes, é preciso observar alguns parâmetros biológicos, tais como o período larval e a mortalidade dos insetos, já que a sua adição deve levar a uma alta viabilidade larval e um período juvenil similar ao natural (RIBEIRO, 2017).

Segundo Habib (1980), deve - se eliminar os ovos contaminados, constatados através do exame de macerado de ovários de fêmeas - mãe ao microscópio. Os esporos de microsporídeos são eliminados sob temperatura de

24 horas, sendo esse tratamento térmico desejável para materiais não biológicos.

A utilização de Benomyl (fungicida), na base de 250 ppm pode ser recomendada para alguns casos. O fumidil B (fumagilina), pode ser usada na base de 25 mg/l de dieta (ALVES,1986).

Macedo et al. (2001), testaram vários antibióticos em 3 experimentos realizados para o controle de protozoários em criações massais de *D. saccharalis* como: Estolato de Eritromicina; Sulfametoxazol + Trimetoprima; Furazolidona; Metronidazol Benzoi; Sulfametoxazol + Trimetoprima; Ampicilina Triidratada + Ampicilina sódica; Benomyl; Estolato de Eritromicina; Fosfato Complexo de Tetraciclina; Cefadroxil; Estolato de Eritromicina os que apresentaram os melhores parâmetros em termos de lagartas aptas para uso como hospedeiros de *C. flavipes*, obtenção de crisálidas e adultos morfológicamente perfeitos foram: Fosfato Complexo de Tetraciclina; Cefadroxil; Sulfametoxazol + Trimetoprima e Benomyl, foram os que permitiu mantê-los em níveis de controle associados a medidas profiláticas.

Simões (2012), testou produtos Itraconazol® (itraconazol) (0,04 e 0,08 g), Flagimax (metronidazol) (0,05 e 0,1g), Neofedipina (neofedipina) (0,04 e 0,08g), Albendy (albendazol) (0,4 e 0,08g), própolis (0,2 e 0,4g) e Derosol (benzimidazol) (0,15 e 0,20µl), em duas dosagens, em lagartas de *D. saccharalis* infectadas e não infectadas pelo protozoário e alimentadas com dieta artificial na qual, cada produto antimicrobiano foi incorporado na dieta e verificou que a mortalidade nas lagartas que ingeriram as dietas com os produtos testados não diferiu das lagartas infectadas e sem adição dos produtos, indicando que eles não foram eficazes na eliminação do protozoário.

Aragão et. al. (2015), realizaram um experimento no qual os produtos foram incorporados a 100 mL de dieta de King e Hartley (1985) nas quantidades: 2,50 mg de Quinina (Q); 35,14 mg de Tiabendazol (T); 41,17 mg de Metronidazol (M); 8,30 mg de Albendazol (A); 0,05 mg de Fumagillin (F) e 0,05 mg de Sinefungin (S), e as dietas contendo os produtos foi oferecida a lagartas no 3º instar 3 dias antes da inoculação por via oral. A inoculação foi realizada adicionando 5µL da solução de esporos sob um círculo de dieta de 0,1 cm<sup>3</sup> que foi oferecido às lagartas não infectadas e lagartas infectadas por ± 36h. Após 10 dias da inoculação, as lagartas foram pesadas e maceradas em solução salina

para a análise do nível de infecção, as lagartas foram pesadas e maceradas em solução salina para a análise do nível de infecção, estimado pela quantidade de esporos por campo de leitura em microscópio óptico (1000x) e verificaram que A ingestão da dieta contendo os produtos não impactou negativamente o desenvolvimento das lagartas e os produtos Albendazol, Sinefungin e Metronidazol reduziram 78,6; 78,6 e 85,7% .

Embora haja protozoários do gênero *Nosema* sp, na maioria das criações da broca-da-cana e que causa danos e prejuízos nestes laboratórios desde 1970, poucos são os estudos sobre o controle desse protozoário que se mantém durante todo o desenvolvimento da broca, inclusive podendo afetar o desenvolvimento do parasitóide *Cotesia flavipes*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Considerando a importância do controle biológico da *Diatraea saccharalis* e para minimizar os problemas causados por protozoários nessas criações, o trabalho tem por objetivo testar o efeito de dois antibióticos (Annita® e Flagyl®) no controle de protozoários do gênero *Nosema*, que se desenvolve em criações de *Diatraea saccharalis*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Testar o efeito dos antibióticos acrescentados na dieta em duas doses diferentes (D1 e D1/2) e qual efeito eles obtiveram no controle de protozoários em diferentes fases da *D. saccharalis*.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Departamento de Biotecnologia de Produção Vegetal e Animal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos, em Araras-SP.

A broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), foi criada em dieta artificial de Hensley e Hammond modificada (CARVALHO et al. 1991), conforme metodologia descrita por Macedo e Campos (1998) e, utilizada na condução do experimento com o objetivo de avaliar o efeito dos antibióticos sobre os protozoários microsporídeos que infestam as criações, avaliando-se lagartas aptas (sadias), formação de pupas e adultos morfológicamente perfeitos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por cinco tratamentos e seis repetições cada, os antibióticos utilizados e as respectivas dosagens encontram-se na Tabela 1.

Tratamentos	Nome comercial	Ingrediente ativo	Doses do produto comercial (Kg)	
			D1	D1/2
T1	(Testemunha)*	Dieta padrão		
T2	Annita <sup>®</sup>	Nitazoxanida + dieta	500 mg	-
T3	Annita <sup>®</sup>	Nitazoxanida + dieta	-	250 mg
T4	Flagyl <sup>®</sup>	Metronidazol + dieta	400 mg	-
T5	Flagyl <sup>®</sup>	Metronidazol + dieta	-	200 mg

\*Dieta padrão utilizada no laboratório

**Tabela 1.** Tratamentos e dosagens dos antibióticos testados. Araras - SP, 2020.

Os testes foram iniciados com a pesagem e preparo das dietas (Tabela 2), acrescentando os antibióticos Nitazoxanida e Metronidazol, de acordo com cada tratamento. Após a pesagem dos ingredientes, com exceção do ágar-ágar

(caragenina), todos são colocados no liquidificador + 1.000 ml de água destilada e agitados por 5 minutos. Para o preparo do ágar-ágar foi utilizado 1.400 ml de água destilada + ágar-ágar (caragenina). Em seguida na mesma panela foram misturados todos os ingredientes do liquidificador com o ágar-ágar (caragenina) e agitado com a batedeira. Depois de pronta, a dieta foi distribuída em frascos de vidro e esterilizada em luz germicida por 50 minutos.

Cada dieta foi preparada separadamente e, colocado um volume de 200 ml da dieta, em cada frasco de vidro transparente de 500 ml (Figura 1).

INGREDIENTES	Tubo/Frasco		Bandeja	
	1	1/2	1	1/2
Ácido Ascórbico	5 grs	3 grs	2 grs	1 grs
Açúcar	135 grs	67 grs	135 grs	67 grs
Sais de Wesson	20 grs	10 grs	-	-
Metilparahidroxibenzoato	4,5 grs	2,8 grs	5,5 grs	2,8 grs
Germe de Trigo	80 grs	40 grs	40 grs	20 grs
Caragenina (Agar-Agar)	30 grs	15 grs	35 grs	15 grs
Farelo de Soja	105 grs	52 grs	195 grs	97 grs
Cloreto de Colina	1 gr	0,5 grs	1 gr	0,5 gr
Estolato de eritromicina	5 ml	2,5 grs	5 ml	2,5 ml
Vita Gold	1 ml	0,5 grs	1 ml	0,5 ml
Solução Vitamínica*	25 ml	13 ml	15 ml	7,5 ml
Formol	2 ml	1 ml	2 ml	1 ml
Ácido Acético	-	-	5 ml	2,5 ml
Água Destilada no Liquidificador	1.000 ml	500 ml	1.000 ml	500 ml
Água Destilada na Panela	1.400 ml	700 ml	1.100 ml	550 ml

\* Solução vitamínica composta de 500ml de água destilada, um frasco via seca e 1 frasco via úmida.

**Tabela 2.** Dieta artificial para criação de *Diatraea saccharalis* (Hensley e Hammond, 1968, modificada por Macedo, 2000). Araras – SP, 2020.



**Figura 1.** Frasco de vidro transparente contendo dieta, Araras-SP,2020.

Em seguida, após o esfriamento das dietas, os ovos obtidos de adultos *Diatraea saccharalis* (Figura 2), foram colocados sobre as dietas e, fechados com tampa plástica com rosca e fundo de tela metálica e acondicionados em prateleiras e mantidos à temperatura de 28<sup>o</sup> C e fotofase de 10 horas, para desenvolvimento (Figura 3).



**Figura 2.** Câmaras de acasalamento para obtenção dos ovos de *D. saccharalis*. Araras-SP, 2020



**Figura 3.** Frascos com os diferentes tratamentos contendo dieta e ovos para o desenvolvimento de lagartas de *D. saccharalis*. Araras-SP, 2020.

Após 18 dias da colocação dos ovos nos frascos, foram feitas as revisões dos frascos, retirando-se as lagartas e selecionando-as em "aptas", as que apresentavam coloração típica, tamanho mínimo de 2 cm e boa mobilidade, e "não aptas" as lagartas com presença de grumos esbranquiçados com o abdome, pequenas e enrugadas (Figura 4).



**Figura 4.** Seleção de lagartas de *D. saccharalis* aptas "viáveis" e não aptas, "não viáveis". Araras – SP, 2020.

As lagartas aparentemente saudáveis foram transferidas para caixas plásticas (5 lagartas/caixa) e realimentadas com as dietas dos mesmos tratamentos em que foram criadas (Figura 5).



**Figura 5.** Lagartas de *D. saccharalis* sadias “aptas” e realimentadas de acordo com os tratamentos propostos. Araras - SP, 2020.

Após a formação das pupas, elas foram retiradas, selecionadas, desinfetadas com uma solução de sulfato de cobre e, as defeituosas “imperfeitas” foram eliminadas e as pupas perfeitas foram acondicionadas em frascos plásticos, forrados com papel sulfite umedecido com água destilada, permaneceram até a emergência dos adultos (Figura 6).



**Figura 6.** Pupas perfeitas e imperfeitas de *D. saccharalis* selecionadas de acordo com os tratamentos. Araras - SP, 2020.

A partir das porcentagens de lagartas aptas, crisálidas e adultos perfeitos calculou-se o índice de eficiência, que corresponde ao número de adultos perfeitos obtidos de cada 100 lagartas que sobreviveram em cada tratamento.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos durante as avaliações das lagartas de *Diatraea saccharalis*, aptas (viáveis) e não aptas (não viáveis), nos cinco tratamentos e nas 6 repetições estão apresentados na Tabela presente no Anexo A.

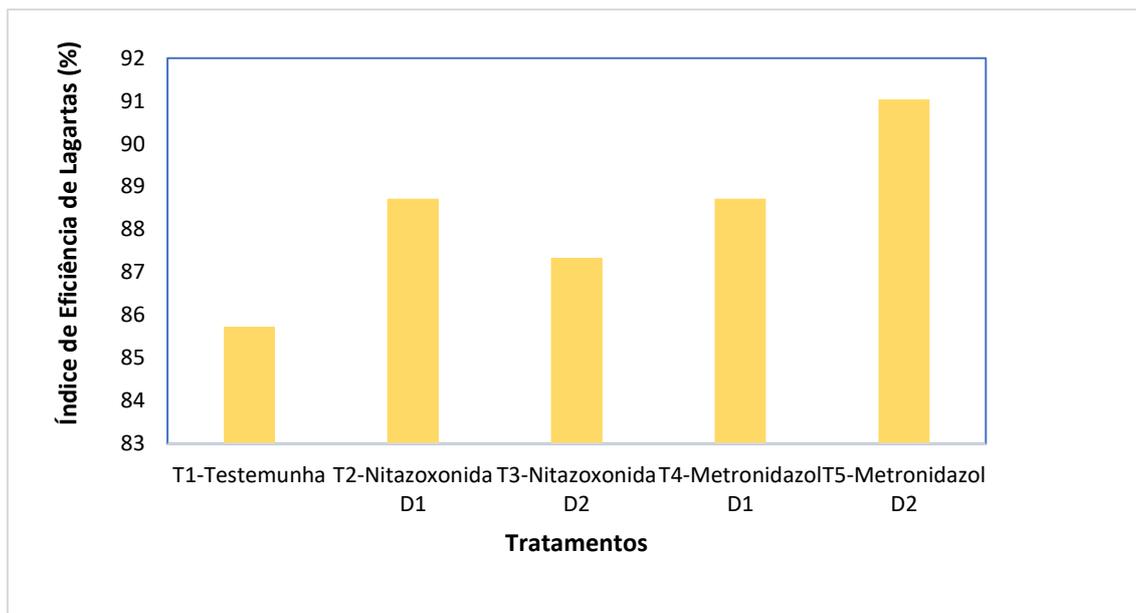
A partir dos dados obtidos, foram calculados os índices de eficiência para as lagartas de *D. saccharalis*, e os respectivos valores encontram-se na Tabela 3.

Tratamentos	Viabilidade de Lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i>			
	Aptas	Não aptas	não aptas (%)	Índice de Eficiência (%)
T1- Testemunha	571	95	14,26	<b>85,73 a</b>
T2- Nitazoxonida (D1)	661	84	11,27	<b>88,72 a</b>
T3-Nitazoxonida (D2)	725	105	12,65	<b>87,34 a</b>
T4-Metronidazol (D1)	732	93	11,27	<b>88,72 a</b>
T5-Metronidazol (D2)	691	68	08,95	<b>91,04 a</b>
CV				114,16

Obs. De acordo com ANOVA e teste de Tukey letras iguais indicam que a 1% e 5% de significância não existe diferença significativa entre as médias

**Tabela 3.** Número de lagartas de *D. saccharalis*, aptas e não aptas e respectivas porcentagens e índice de eficiência. Araras - SP, 2020.

Os dados da Tabela 3, indicam através dos índices de eficiência na criação de *D. saccharalis*, que não houve diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, a ação dos antibióticos na dieta artificial para o controle dos protozoários, teve um desempenho semelhante no desenvolvimento das lagartas, com um controle acima de 80%, mesmo o T1-Testemunha sendo ligeiramente inferior o T4-Metronidazol (D2), ligeiramente superior aos demais. A Figura 7, apresenta a porcentagem do índice de eficiência de lagartas sadias (viáveis) por tratamento.



**Figura 7** - Lagartas aptas de *D. saccharalis*, por tratamento. Araras – SP, 2020.

Os índices de eficiência acima de 80%, obtidos nos tratamentos vão de encontro a citação de Parra (2012), que uma dieta artificial precisa fornecer todos os nutrientes necessários através do qual ele consiga ter um crescimento ótimo, tendo uma sobrevivência que seja superior a 75%.

Entretanto, Simões (2012), testou produtos Itraconazol® (itraconazol) (0,04 e 0,08 g), Flagimax (metronidazol) (0,05 e 0,1g), Neofedipina (neofedipina) (0,04 e 0,08g), Albendy (albendazol) (0,4 e 0,08g), própolis (0,2 e 0,4g) e Derosol (benzimidazol) (0,15 e 0,20 $\mu$ l), em duas dosagens, em lagartas de *D. saccharalis* infectadas e não infectadas pelo protozoário e alimentadas com dieta artificial na qual, cada produto antimicrobiano foi incorporado na dieta e verificou que a mortalidade nas lagartas que ingeriram as dietas com os produtos testados não diferiu das lagartas infectadas e sem adição dos produtos, indicando que eles não foram eficazes na eliminação do protozoário.

Já Aragão et. al. (2015), realizaram um experimento no qual os produtos foram incorporados a 100 mL de dieta de King e Hartley (1985) nas quantidades: 2,50 mg de Quinina (Q); 35,14 mg de Tiabendazol (T); 41,17 mg de Metronidazol (M); 8,30 mg de Albendazol (A); 0,05 mg de Fumagillin (F) e 0,05 mg de Sinefungin (S), e as dietas contendo os produtos foi oferecida a lagartas no 3º instar 3 dias antes da inoculação por via oral e verificaram que a ingestão da dieta contendo os produtos não impactou negativamente o desenvolvimento das

lagartas e os produtos Albendazol, Sinefungin e Metronidazol reduziram 78,6; 78,6 e 85,7% .

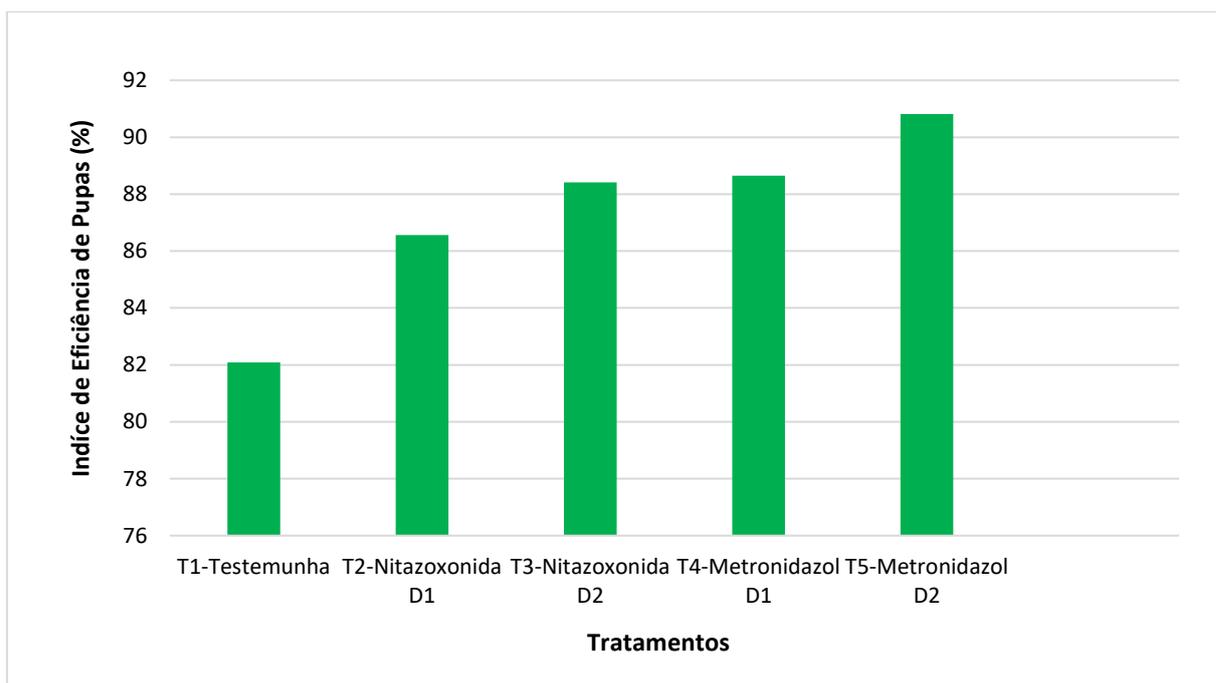
Das lagartas aptas (viáveis) aparentemente perfeitas, que foram realimentadas com as dietas dos mesmos tratamentos em que foram criadas, obteve-se as pupas de *D. saccharalis*, que passaram por uma seleção rigorosa quanto à presença de deformações e presença de manchas pretas, sinais característicos de protozoários. De acordo com Parra (2015), a presença de manchas pretas melanizadas no tegumento das lagartas, movimentos lentos; perda de locomoção; desenvolvimento anormal; alimentação reduzida, caracteriza a presença de microsporídeos nas criações de insetos. A Tabela 4, apresenta os dados da seleção das pupas, perfeitas e imperfeitas.

Tratamentos	Viabilidade de Pupas de <i>Diatraea saccharalis</i>			
	Perfeitas	Imperfeitas	Imperfeitas (%)	Índice de Eficiência (%)
T1- Testemunha	376	82	21,80	82,09 a
T2- Nitazoxonida (D1)	477	74	15,51	86,56 a
T3-Nitazoxonida (D2)	519	68	13,10	88,41 a
T4-Metronidazol (D1)	555	71	12,79	88,65 a
T5-Metronidazol (D2)	594	60	10,10	90,82 a
CV (%)				11,11

Obs. De acordo com ANOVA e teste de Tukey letras iguais indicam que a 1% e 5% de significância não existe diferença significativa entre as médias

**Tabela 4.** Número de pupas de *D. saccharalis*, perfeitas e imperfeitas e respectivas porcentagens e índices de eficiência. Araras-SP, 2020.

Nota-se que não houve diferença significativa dos índices de eficiência entre os tratamentos, ou seja, a ação dos antibióticos foi semelhante entre os tratamentos, mas quando se observa a porcentagem de pupas imperfeitas o T5 - Metronidazol D2, aparentemente, foi superior aos demais tratamentos permitindo uma formação mais perfeita das pupas. A Figura 8, apresenta a porcentagem do índice de eficiência de pupas perfeitas (viáveis) por tratamento que ficou acima de 80%.



**Figura 8** – Pupas perfeitas de *D. saccharalis* por tratamento. Araras – SP, 2020.

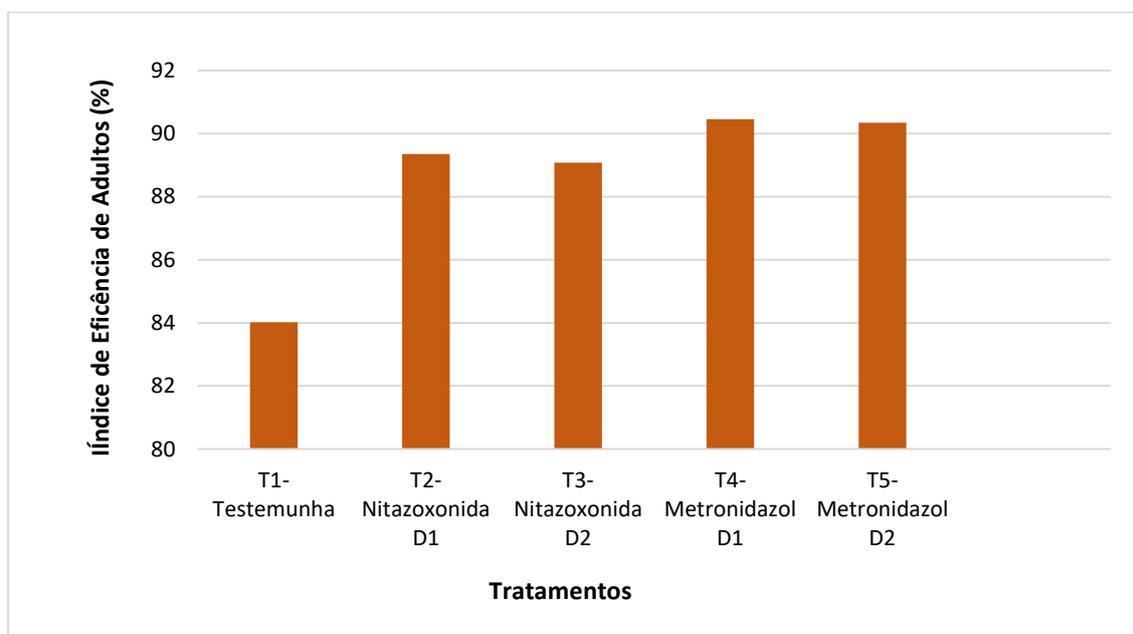
Após o desenvolvimento das pupas perfeitas, nasceram os adultos de *D. saccharalis* que passaram por uma seleção quanto à presença de deformações, sinais característicos de protozoários e, após essa seleção foi elaborada a Tabela 6, que apresenta os dados de adultos perfeitos e imperfeitos.

Tratamentos	Viabilidade de Adultos de <i>Diatraea saccharalis</i>			
	Perfeitos	Imperfeitos	Imperfeitas (%)	Índice de Eficiência (%)
T1- Testemunha	294	52	17,68	<b>84,02 a</b>
T2- Nitazoxonida (D1)	403	48	11,91	<b>89,35 a</b>
T3-Nitazoxonida (D2)	351	43	12,25	<b>89,08 a</b>
T4-Metronidazol (D1)	484	51	10,53	<b>90,46 a</b>
T5-Metronidazol (D2)	534	57	10,67	<b>90,35 a</b>
CV (%)				8,65

Obs. De acordo com ANOVA e teste de Tukey letras iguais indicam que a 1% e 5% de significância não existe diferença significativa entre as médias

**Tabela 5.** Número de adultos de *D. saccharalis*, perfeitos e imperfeitos e respectivas porcentagens e índices de eficiência, Araras-SP, 2020.

Os dados de eficiência da Tabela 5 e Figura 9, mostraram-se equivalentes, mesmo a porcentagem de adultos imperfeitos ser um pouco elevada em relação aos demais tratamentos.



**Figura 8** – Adultos perfeitos de *D. saccharalis* por tratamento. Araras – SP, 2020.

Isto significa que além da adição dos antibióticos nas dietas, a seleção de lagartas e pupas, é um fator primordial pois, contribuem para uma melhora significativa da limpeza dos protozoários nas criações de insetos.

De acordo com MACEDO (2000), as contaminações de protozoários vêm sendo mais frequentes e difíceis de controlar nas criações de *D. saccharalis*, pelo fato de que não haver produtos específicos para seu controle e que eles passam de uma geração para outra através da transmissão transovogênica e transovariana. Em quase todas as criações desses insetos em laboratório existe a contaminação por protozoários, os níveis de sintomas que eles causam na população varia de acordo com o nível em que as contaminações se encontram.

No caso das criações de *D. saccharalis* medidas profiláticas como: eliminação de lagartas com sintomas visíveis a olho nu e eliminação de crisálidas e adultos com sintomas visíveis, embora não elimine 100% do agente patogênico, permite mantê-lo em níveis de controle (MACEDO et al.,2001).

## 6. CONCLUSÃO

Os produtos Annita<sup>®</sup> (nitazoxanida) e Flagyl<sup>®</sup> (metronidazol) nas dosagens (D1 e D 1/2), usadas no experimento indicaram bons índices de eficiência para a diminuição de protozoários presentes nas criações massais de *Diatraea saccharalis*, e desde que associados a uma rigorosa seleção de lagartas, pupas e adultos, com sintomas de infecção por microsporídeos, obtêm-se um maior controle na quantidade de protozoários nas ao passar das gerações nas criações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVERSON. J.; CONHEN A. C. Effect of Antifungal Agents on Biological Fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *Journal of economic entomology*. Mississippi v. 95, n. 2, 256-260, abril, 2002.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; GARCÍA, J. J.; MICIELI, M. V.; MARTI A. G.; PELIZZA S. A. Uso de protozoários entomopatogênicos em programas de controle microbiano nos países latino-americanos. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Ed.). *Controle microbiano de pragas na América Latina*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.203 - 211.

ALVES, S. B.; MOINO Jr., A. Manutenção de insetos livres de agentes patogênicos, p. 799-814. In: ALVES, S. B. (Coord.). *Controle microbiano de insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, S B. Produção de vírus, protozoários e nematóides entomopatogênicos. *Controle Microbiano de Insetos*. Tradução. São Paulo: Manole, 1986.

ARAGÃO, T.M.S., CRUZI I. S., SIMÕES, R. A., VELARDE J. M., D. S. VELARDE, MENDONÇA, M.C. Avaliação de produtos químicos no controle de *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) em criações de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). 14º Simpósio Brasileiro de Controle Biológico. 2015.

ARRIGONI, E. B. Problemas atuais e futuros desafios. **Revista Opiniões**. Sucrenergético: cana, açúcar, etanol & bioeletricidade. Editora WDS Ltda. Editora VRDS Brasil Ltda. Ano15. N 56. p. 18-19. Abril - Jun., 2018.

BASTOS, E. *Cana-De-Açúcar: O Verde Mar De Energia*. p.9. Ed. Ícone. São Paulo, 1987.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P. et al. (Ed.). *Controle biológico no Brasil*. São Paulo: Manole, 2002. cap. 25, p. 409-426.

BOTELHO, P.S.M. Quinze anos de controle biológico de *Diatraea saccharalis* utilizando parasitoides. Pesquisa Agropecuária Brasileira 27: 255–262. 1992

CARVALHO, L. R. R.; ARAÚJO, J. R.; CAMPOS, M. B. S. Uso de levedura de usina na criação de *D. saccharalis* em laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, Recife, 1991. Resumos. SEB, Recife, 1991. p. 36

CASTELLO BRANCO Jr. Protozoários Entomopatogênicos. In: S. B. Alves (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Piracicaba, FEALQ, 1998, cap. 17, p. 571-603.

CESNIK R. e MIOCQUE, J., Melhoramento da cana-de-açúcar, 2004, EMBRAPA.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (Brasil). (2022). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar – Safra 2021-22, Brasília, DF, 2022.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M DE; LANDELL, M. G. DE A. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008.

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

GARCIA J. F.; BOTELHO P. S. M. *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera – Crambidae). In: SIMÕES, N., GARCIA, J. F., editores. Cana-de-açúcar: pragas e doenças: desafios fitossanitários e manejo sustentável. Jaboticabal, Brasil: Gráfica Multipress Ltda; 2016. p. 160.

GARCIA, J. F. Manual de identificação de pragas da cana. Campinas: FMC Agrícola, 2013.

HABIB, M. E. M. Aspectos sanitários em criações de insetos. In: Anais do Congresso Brasileiro de Entomologia, 1980. p. 185-192.

HURD, H. Reproductive disturbances induced by parasites and pathogens of insects, p. 87-93. In: BECHAGE, N. E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). Parasites and pathogens of insects, San Diego, v. 1, 1993.

MACEDO, N.; BOTELHO, P. S. M.; DEGASPARI, N.; ALMEIDA, L. C.; ARAÚJO, J. R.; MAGRINI, E. A. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar: manual de Instrução. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 1983. 22 p.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M. Ten years of biological control of *Diatraea saccharalis* by *Apanteles flavipes* In São Paulo. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 19., Jakarta, 1986. Proceedings... Jakarta: ISSCT, 1986.

MACEDO, N.; CAMPOS, M.B.S. Inovações tecnológicas na criação massal de *Diatraea saccharalis* para o controle biológico. STAB: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, v.17, n.2, p.46-49, 1998.

MACEDO, N.; CAMPOS, M. B. S.; MACEDO, D. Controle de protozoários em criações massais de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas. 2001. p. 328.

MACEDO, C. L.; MARTINS, É. S.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, A. C.; PRAÇA, L. B.; GÓIS, L. A. B.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.47, p.1759-1765, 2012

MACEDO, N. Método de criação de parasitoide. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras, MG: Editora UFLA, 2000, p. 161 – 173.

MATSUOKA, S. Botânica e ecofisiologia da cana-de-açúcar. Araras: UFSCar, 1996. 93p.

MENDES, S. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I.; WAQUIL, J. M. Controle de Pragas. In A. May, F. O. M. Durães, I. A. Pereira Filho, R. E. Schaffert, & R. A. da C. Parrella (Eds.). Sistema Embrapa de produção de sorgo para bioetanol: Sistema BRS1G—Tecnologia Qualidade Embrapa. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

MENDONÇA, A. F.; RISCO, S. H. B.; COSTA, J. M. B. Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hym.: Braconidae) in Brasil. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 16., São Paulo, 1977. v1. p.703-710.

MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; SANTOS, J. M. dos; SAMPAIO, M.; CÂMARA, T. M. M.; SILVA, P. de A.; BARBOSA, G. V.; HOFFMAN, H. P.; CHAPOLA, R. G.; JÚNIOR, A. R. F.; GAZAFFI, R. Melhoramento genético de cana-de-açúcar. Aracaju: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, 2015. 38 p.

MOZAMBIONI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (org.). Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: CP 2, 2006. P. 11-18.

NAKANO, O.; Entomologia Econômica. Piracicaba: FEALQ, 2011 464p.

OLIVEIRA, A. C. S.; FERNANDES, P. G.; PRELLWITZ, W. P. V; RUBIM, R. F.; AZEVEDO, P. H. D. DE A. M. Avaliação econômica de cana-de-açúcar em sistema de plantio direto em comparação ao convencional em Campos dos

Goytacazes-RJ. Vértices, Campos Dos Goytacazes, v. 13, n. 1, p.105-114, abr. 2001. 34p

PARRA, J.R.P.; PANIZZI, A.R.; HADDAD, M.L. Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimento por insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Soja, 2009. p.37-90.

PARRA, J. R. P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 6 ed. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2015.

PÉREZ, K. G. Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* a Cry1Ab e comportamento larval em cana-de-açúcar. 70 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.

PINTO A. D. S.; BOTELHO O. S. M.; OLIVEIRA H. N. Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar. CP 2, Piracicaba, 160p. 2009

PINTO, A. D. S.; CANO, M. A. V.; SANTOS, E. M. A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*. In: PINTO, A. de S. (org.) Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho: Biocontrol, 2006. p.15-20. (Boletim Técnico Biocontrol).

PINTO A. D. S.; LOPES V. L.; LIMA A. A. Manejo de pragas da cana-de-açúcar. In: Santos F, Borém A (Orgs) Cana-de-açúcar: do plantio à colheita. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp 73–87, 257p. 2013.

PRECETTI, A. A. C. M.; TERÁN, F. O.; SANCHEZ, A. G. Alterações nas características tecnológicas de algumas variedades de cana-de-açúcar, devidas ao dano da broca *Diatraea saccharalis*. Boletim Técnico Copersucar, v. 40, p.3-8, 1988.

RENZI, A.; HENZ, A. P.; ZIDORA, C. B. M.; SHIKIDA, P. F. A. Evolução do controle biológico de insetos e pragas no setor canavieiro: uma análise na perspectiva

econômica. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 459, 2019.

RIBEIRO, Z. A. Dieta artificial e metodologia de criação massal para o bem-estar de *Helicoverpa armigera*. 2017. f. 137. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

ROS, P.B. Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 2004. 58f. Tese (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SIMÕES, R. A., Alterações nos parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) causadas por *Nosema* sp. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia. Piracicaba, 2012.

SILVA, J. Broca da cana de açúcar *Diatraea saccharalis*. AFOCAPI/COPLACANA, Departamento Técnico Agrônomo, Piracicaba SP, 2004.

SIKOROWSKI, P. P.; LAWRENCE, A. M. Major diseases of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in Mississippi fields and insectaries. Mississippi: MAFES, 1997. 58 p. (MAFES. Technical Bulletin, 218).

SINGH, P.; HOUSE, H. L. Antimicrobials: ‘safe’ levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. Journal of Insect Physiology, Ontario. v. 16, n. 9. p. 1769-1782. 1970.

SOARES Jr., G. G. Problems with entomophatogens in insect rearing. In: ANDERSON, T. E.; LEPPLA, N. C. (Ed.). Advances in insect rearing for research and pest management. Boulder: Westview Press, 1992. p. 289-322.

VAN LENTEREM, J. C., Controle de qualidade de agentes de controle biológico produzidos massalmente: conhecimento, desenvolvimento e diretrizes. In Bueno, VHP. (Ed.). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: UFLA. 2000, p. 21-40.

VAVRA, J., HYLIS, M., VOSSBRINCK, C.R., PILARSKA, D.K., LINDE, A., WEISER, J., MCMANUS, M.L., HOCH, G., SOLTER, L.F. 2006. *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A Redescription and Taxonomic Revision of *Thelohania disparis* Timofejeva 1956, a Microsporidian Parasite of the Gypsy Moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). The Journal of Eukaryotic Microbiology, 53 (4), 292–304.

WEINER, R.; CLINGAN, G. Brazil is zooming ahead on ethanol. The Miami Herald. 2012.

## ANEXO A

**Tabela:** Lagartas (aptas e não aptas), por tratamento e repetições. Araras-SP, 2020.

Avaliação das Lagartas de <i>D. saccharalis</i>												
Tratamentos/ Repetições	T1		T2		T3		T4		T5		Total	
	Testemunha		Nitazoxonida (D1)		Nitazoxonida (D1/2)		Metronidazol (D1)		Metronidazol dieta (D1/2)		Aptas	Não Aptas
	Aptas	Não Aptas	Aptas	Não Aptas	Aptas	Não Aptas	Aptas	Não Aptas	Aptas	Não Aptas	Aptas	Não Aptas
R1	118	13	77	14	91	09	126	07	63	17	475	60
R2	77	30	154	28	126	15	126	09	126	03	609	85
R3	103	11	126	11	112	04	70	11	140	11	551	48
R4	112	23	98	03	140	33	154	10	112	05	616	74
R5	91	09	147	22	147	19	151	30	140	25	676	105
R6	70	09	59	06	109	25	105	26	110	07	453	73
<b>Total</b>	<b>571</b>	<b>95</b>	<b>661</b>	<b>84</b>	<b>725</b>	<b>105</b>	<b>732</b>	<b>93</b>	<b>691</b>	<b>68</b>	<b>3.380</b>	<b>445</b>