

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
MEDICINA VETERINÁRIA

ÁTILA SCHAFFER MORAIS

**PATOGENICIDADE *in vitro* DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE
Metarhizium anisopliae SOBRE *Alphitobius diaperinus***

CRUZ DAS ALMAS – BA

2018

ÁTILA SCHAFFER MORAIS

**PATOGENICIDADE *in vitro* DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE
Metarhizium anisopliae SOBRE *Alphitobius diaperinus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

CRUZ DAS ALMAS – BA

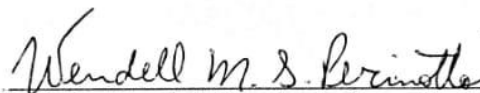
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

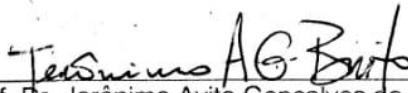
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ÁTILA SCHAFFER MORAIS

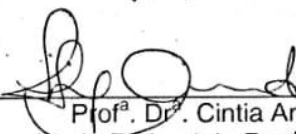
PATOGENICIDADE *IN VITRO* DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE
METARHIZIUM ANISOPLIAE SOBRE *ALPHITOBIUS DIAPERINUS*



Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Jerônimo Avito Gonçalves de Brito
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof.ª Dr.ª Cintia Armond
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 09 de agosto de 2018.

DEDICATÓRIA

Ao meu saudoso pai, Otoniel, a minha mãe Lucia e aos meus irmãos Patrícia, Diogo e Maysa por todo carinho e confiança em mim depositados. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e aos meus pais por me proporcionarem o grande privilégio de estudar e concluir o ensino superior, conquistando o sonho de me tornar Médico Veterinário.

A minha família, por todo amor e carinho e confiança.

Ao meu saudoso pai, Otoniel, por todos os ensinamentos, conselhos e virtudes que transmitiu durante toda minha vida. Por ser um exemplo como homem, pai, profissional, professor, agricultor e agrônomo.

A minha mãe, Lucia, mulher, independente, mãe, guerreira, muitas vezes pai e mãe, que apesar de todas as dificuldades nunca me deixou faltar nada. Obrigado por sempre confiar em mim e no meu potencial.

Aos meus irmãos, Patrícia, Diogo e Maysa, por sempre acreditar em meu potencial.

A Nádia Márcia, fiel companheira do meu pai, que tem feito de tudo para tentar suprir a ausência dele. Você é um exemplo de ser humano, um verdadeiro anjo.

Aos meu Tio Agenor e minha Tia Socorro, pela guarida e hospitalidade durante meu período de estágio em Lauro de Freitas.

A minha noiva, amiga e companheira Bruna, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as decisões.

Aos meus filhos de quatro patas: Caboclo e Jolie, que sempre me lembram o que é amizade e amor.

A todos os mestres da UFRB, em especial aos professores Pedro, Luciano, Cristiane e Wendell pelas oportunidades e confiança em meu trabalho. A professora Leticia, por ser um exemplo como profissional, mulher de fibra e que sempre lutou por nós estudantes.

Ao CABALLUS, onde tive minha primeira oportunidade de liderança e responsabilidade.

A meu orientador Wendell, pela paciência e conhecimentos a mim transmitidos.

Aos meus amigos de Cruz. Em especial: Indiana, Deda, Mãe, Isabella, Bury, Bea, Potter, Indy, Zedu, Mudo, Anita, Kaic, lally, Gian, Didi, Talitão, Jaredão, Juneira, Rasta, Valbin, Dum, Cain e Willes.

Aos meus amigos de infância e que me acompanham até hoje, Vitor e Valério.

Por último e não menos importante, a professora Cinthia Armond por ceder o seu laboratório onde parte do experimento foi realizado e a Koppert Brasil pelo fornecimento do produto Metarril E9 WP Organic®.

RESUMO

Alphitobius diaperinus é um inseto da ordem Coleoptera, conhecido popularmente como cascudinho dos aviários, que se adapta facilmente ao ambiente devido à disponibilidade de alimento e umidade presentes na cama. Apresenta grande capacidade de proliferação e de resistência aos tratamentos convencionais tanto os químicos quanto os mecânicos, causando prejuízos significativos à avicultura nacional. Nesta perspectiva, métodos alternativos vêm sendo estudados, dentre estes se destaca o controle biológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de uma formulação comercial à base de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *A. diaperinus* em testes *in vitro*. Para a realização dos ensaios biológicos, os insetos foram coletados em um aviário localizado no município de Governador Mangabeira – BA, em seguida foram levados ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde foi realizada a sexagem dos adultos. No delineamento experimental foram formados seis grupos, cada um contendo seis unidades experimentais, as quais continham cinco casais em cada. Para preparo das formulações fúngicas seguiu-se as recomendações do fabricante, porém, na água utilizada para suspender os conídios foi acrescida Tween 20. Esta suspensão foi preparada utilizando 100 mL de água destilada estéril, 4µL de Tween 20 e 5g da formulação comercial à base de *M. anisopliae*. Após esta etapa inicial, foram separadas duas alíquotas de 30 mL desta suspensão e nelas adicionadas óleo vegetal de soja nas concentrações de 5 e 10%. Como controles foram utilizados um grupo contendo apenas água e dois contendo solução de água destilada e Tween 20 acrescidas de óleo vegetal a 5 e 10%. Após o tratamento, as placas foram mantidas em estufa climatizada tipo B.O.D. com temperatura e umidade controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\% \pm 5\% \text{ UR}$) e monitoradas a cada três dias por 12 dias consecutivos, para avaliar o percentual de mortalidade dos artrópodes. Como resultados pode-se observar que todos os grupos que continham óleo, inclusive os grupos controles oleosos, causaram mortalidade significativamente maior do que os grupos aquosos. Diante disso, é possível concluir que o óleo vegetal de soja apresenta letalidade para *A. diaperinus* e que a formulação comercial de Metarril sem a adição de óleo não apresenta ação patogênica para esse inseto.

Palavras-chave: Cascudinho, controle biológico, avicultura, fungo entomopatogênico.

ABSTRACT

Alphitobius diaperinus is an insect of the order Coleoptera, popularly known as birdwatcher, which adapt easily to the environment due to the availability of food and humidity present in the bed. They present great capacity for proliferation and resistance to conventional treatments, both chemical and mechanical, causing significant losses to the national poultry industry. Thus, the objective of this work was to evaluate the pathogenicity of a commercial formulation based on *Metarhizium anisopliae* on adults of *A. diaperinus* in vitro tests. For the biological tests, the insects were collected in an aviary located in the Municipality of Governador Mangabeira - BA, then were taken to the Laboratory of Parasitology of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, where adult sexing was performed. In the experimental design, six groups were formed, each containing six experimental units, which contained five pairs each. For preparation of the fungal formulations the manufacturer's recommendations were followed, however, in the water used to suspend the conidia was added 0.01% Tween 20. This suspension was prepared using 100mL sterile distilled water, 4 μ L of Tween 20 and 5g of commercial formulation based on *M. anisopliae*. After this initial step, two aliquots of 30 mL this suspension were separated and soybean oil added at 5 and 10% concentrations. As controls were used a group containing only water and two containing solution of distilled water and 0.01% of Tween 20 added to vegetable oil at 5 and 10%. After the treatment, the plates were kept in a climatized lab oven type B.O.D. with controlled temperature and humidity (25°C \pm 1°C and 80% \pm 5% RH) and monitored every three days for 12 consecutive days in order to count for dead insects and fungal growth in arthropods. As a result it can be observed that all the groups that contained oil caused mortality in the insect right after the treatment, including the control groups with oil. Thus, it is possible to conclude that soybean oil presents lethality to *A. diaperinus* and the commercial formulation of Metarril without the addition of oil does not present a pathogenic action for this insect.

Keywords: Avian, lesser mealworm, biological treatment, poultry, Entomopathogenic fungi.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos de tratamento e suas composições	25
Tabela 2 - Média \pm desvio padrão do número de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> mortos após o tratamento com formulações aquosas e oleosas de Metarril E9 WP Organic® em condições <i>in vitro</i> , do dia zero até o 12º dia pós tratamento.	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenciação sexual através da coloração do tegumento.....	22
Figura 2 - Exposição da genitália de <i>Alphitobius diaperinus</i> para diferenciação sexual	23
Figura 3 –Preparo da solução inicial da formulação de Metarril E9 WP Organic®.....	24
Figura 4 - Formulações aquosas e oleosas dos grupos controle e com Metarril E9 WP Organic®.....	24
Figura 5 - Placas contendo os insetos após o tratamento na estufa BOD climatizada 25°C ± 1°C e 80% ± 5 % UR.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
EUA	Estados Unidos da América
HUMV	Hospital Universitário de Medicina Veterinária
LPVDP	Laboratório de Parasitologia Veterinária e Doenças Parasitárias
TGI	Trato Gastrointestinal
mL	Mililitros
g	Gramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. JUSTIFICATIVA	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 Importância da avicultura de corte no Brasil	16
4.2 Aspectos taxonômicos e biológicos de <i>Alphitobius diaperinus</i>	17
4.3 Influência de <i>A. diaperinus</i> na avicultura.....	18
4.4 Métodos de controle.....	19
4.4.1 Controle Químico.....	19
4.4.2 Controle Físico e Mecânico	20
4.4.3 Controle Biológico.....	20
4.5 <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1 Obtenção e sexagem de <i>A. diaperinus</i>	22
5.2 Preparo das formulações aquosas e oleosas	23
5.3 Delineamento experimental e ensaio biológico	25
5.4 Análise estatística	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
7. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de corte brasileira tem se mostrado promissora e importante no crescimento da economia nacional, segundo ABPA (2017), no ano de 2016 o Brasil foi responsável pela produção de 12,9 milhões de toneladas de carne de frango, ficando atrás apenas dos EUA. Entretanto, ocupou o primeiro lugar em exportações de carne de frango com 4,384 milhões de toneladas exportadas.

Por meio de análises do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (CEPEA, da Esalq/USP (2018)), a produção brasileira de carne de frango deve crescer 3,34% no ano de 2018 quando comparada a produção de 2017, com base no histórico nacional. Esse cenário evidencia a importância do mercado externo no crescimento do ramo e da economia nacional. Além disso, reforça a necessidade de a avicultura nacional seguir cumprindo os requisitos sanitários exigidos por importantes demandantes internacionais.

Para a exportação da carne de frango assim como outros produtos de origem animal é obrigatório o selo de inspeção federal (SIF), obtido após a inspeção realizada em estabelecimentos credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2018). Diversos países importadores são bastantes rigorosos não só com a inspeção nos abatedouros, mas também com os sistemas de criação adotados pelos países exportadores. É sabido que importadores como a união europeia, por exemplo, tem demonstrado um maior interesse na compra de produtos orgânicos, para obter este selo é necessário que o produtor se enquadre na legislação destes produtos, estas normas são disponibilizadas pelo MAPA.

Neste contexto, uma importante praga, o inseto *Alphitobius diaperinus*, que acomete os sistemas intensivos de produção de frangos de corte no país, merece destaque, pois tem importância sanitária direta podendo causar estresse, lesões no trato gastrointestinal (TGI) das aves decorrente da ingestão dos insetos e indiretamente atuando como vetor de agentes patogênicos causadores de doenças como a Doença de Marek, Leucose Aviária, Coccidioses, Salmonelose, Clostridiose por *Clostridium perfringens*, Doença de

Newcastle, Influenza Aviária, Doença Bursal Infecciosa e algumas verminoses.(AVANCINI & UETA, 1990; DESPINS et al., 1994; DESPINS & AXTELL, 1995; VITTORI et al., 2007).

De acordo com Mendes e Povaluk (2017), a presença de *A. diaperinus* em aviários é comum, pois fornecem um excelente hábitat para esta espécie, pois além de temperatura e umidade adequada, possuem uma grande quantidade de alimentos, como as carcaças das aves em decomposição, fezes e restos de rações. Um outro fator que predispõe a ocorrência dos cascudinhos nos aviários é a reutilização da mesma cama para lotes diferentes (MCALLISTER et al., 1995; PACHECO & PAULA, 1995).

Segundo Alves et al. (2005), os principais métodos de controle utilizados atualmente são os métodos mecânico e o químico, entretanto, estes apresentam inúmeras dificuldades e até o momento não foi descoberto um método de controle eficiente e seguro.

Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos de controle, onde se destaca o controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, os quais vêm sendo testados sobre diversos artrópodes pragas, inclusive o cascudinho (GEDEN et al., 1998; ROHDE et al., 2006). Todavia, pelo fato dos agentes biológicos necessitarem de um tempo maior para controle, a utilização de formulações que contenham adjuvantes que possam acelerar o processo é de extrema importância e pode contribuir para o estabelecimento de um protocolo com aplicabilidade a campo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade *in vitro* do fungo *M. anisopliae*, como um método de controle biológico, utilizando diferentes formulações a base de um produto comercial sobre *A. diaperinus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito patogênico da formulação comercial de *M. anisopliae* em suspensão aquosa sobre adultos de *A. diaperinus* em condições laboratoriais.
- Avaliar o efeito patogênico da formulação comercial de *M. anisopliae* com a adição de 5 e 10% de óleo de soja sobre adultos de *A. diaperinus* em condições laboratoriais.

3. JUSTIFICATIVA

A presença de populações elevadas do cascudinho, *A. diaperinus*, nos aviários é um dos principais problemas da avicultura brasileira, trazendo prejuízos sanitários, financeiros e a saúde humana. Estes podem deixar resíduos nas carcaças e provocar resistência individual dos insetos aos inseticidas comuns inviabilizando a reutilização da mesma base química. Além disso, o inseto que infesta os aviários pode transmitir doenças e afetar o desenvolvimento das aves. Neste sentido, torna-se importante um estudo acerca de um método de controle biológico alternativo.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Importância da avicultura de corte no Brasil

A avicultura nacional tem alcançado progressos significativos desde a década de 70. Este fato tem transformado o segmento em uma verdadeira potência econômica, representada por uma grande indústria de produção de proteína animal (TINÔCO 2001; GIROTTO & AVILA, 2008).

Além da produção da carne de frango que hoje ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produtores, o Brasil se tornou o maior exportador da proteína, alcançando ganhos iguais a US\$ 7,236 bilhões no ano de 2017 (ABPA, 2018). O setor também tem demonstrado grande importância socioeconômica, pois emprega direta e indiretamente milhares de pessoas, o que gera receita e contribui diretamente com o Produto Interno Bruto do País (DAI PRA & ROLL, 2012).

Estas conquistas se devem as inúmeras inovações na área de genética, nutrição, sanidade e no processo produtivo de forma geral, possibilitando a produção de aves mais pesadas e precoces, o que torna a avicultura nacional mais atraente para o mercado externo, contribuindo para que o setor alcançasse o patamar atual. Destaca-se, também, as melhorias realizadas em manejo, ambiência e sanidade, que proporcionaram um maior bem-estar para as aves dentro dos aviários, melhorando assim, seu desenvolvimento (VOGADO et al., 2016).

Logo, considerando que a produção nacional de carne de frango é competitiva e está em ascensão, assim como o consumo interno e exportações, é possível que novos mercados sejam prospectados (DELIBERALI et al., 2010)

Diante dos fatos, mesmo com o crescimento e organização da cadeia produtiva verificado na avicultura, ainda são necessários constantes estudos relacionados a ambiência, sanidade e bem-estar das aves, para que seja elevada a produtividade e haja redução dos custos (TINÔCO, 2001).

4.2 Aspectos taxonômicos e biológicos de *Alphitobius diaperinus*

Alphitobius diaperinus é um artrópode da classe Insecta pertencente à ordem Coleoptera e à família Tenebrionidae, seu corpo possui formato ovalado, coloração que varia do marrom escuro ao negro, brilhante, com comprimento de 6,0 mm a 6,83 mm e com largura de 2,75 mm a 3,17 mm (CHERNAKI & ALMEIDA, 2001). Originário da África e conhecido popularmente como “cascudinho da cama das aves”, possui distribuição cosmopolita e sua ocorrência está diretamente associada à criação intensiva de aves de corte ou ao armazenamento de grãos (PREISS & DAVIDSON, 1970; EVANS 1981).

O ciclo biológico de *A. diaperinus* em temperatura de 27 °C e umidade relativa do ar de 80% se completa em 55 dias (SILVA et al., 2005). Após cinco dias da postura, dos ovos eclodem larvas esbranquiçadas, medindo 1,5mm de comprimento. A fase larval pode passar por até 11 ínstar de desenvolvimento e se completa com 38 dias, quando estas chegam a medir 13,8mm de comprimento e sua coloração primariamente branca se torna marrom escura (VERGARA & GAZANI, 1996).

Após esta fase, de acordo com Silva et al. (2005), as larvas passam por ecdise e permanecem em forma de pupa por cinco dias, de onde emergem os insetos adultos, inicialmente com coloração branca e, após quatro dias, adquirem coloração característica. Os adultos, por sua vez, iniciam a vida reprodutiva após 20 dias de emergirem da fase de pupa.

O cascudinho, que inicialmente era considerado uma praga associada a estocagem de grãos (LEGNER & OLTON, 1970), tem despertado a atenção de avicultores do mundo inteiro, se tornando uma das principais pragas da avicultura moderna (ARENDS, 1987; STEELMAN, 1996; PAIVA, 2000). Com a expansão da avicultura industrial, este parasita encontrou junto aos aviários habitat ideal para seu desenvolvimento na cama e nos resíduos dos aviários, pois estes se alimentam da própria cama, dejetos, excretas, ração, aves mortas e outros insetos, incluindo a própria espécie (LESCHEN & STEELMAN, 1988).

4.3 Influência de *A. diaperinus* na avicultura

Atualmente, os avicultores se deparam com inúmeros problemas desencadeados por pragas, tais como *A. diaperinus*. O cascudinho possui particularidades que dificultam o seu controle, devido aos seus hábitos biológicos e características comportamentais, que são escavar tuneis no piso e na cama dos aviários e habitar essas galerias, sendo assim considerado um importante vetor de patógenos causadores de doenças nas aves (MENDES & POVALUK, 2017).

Com o crescimento da avicultura, resultado da alta demanda do mercado interno e externo, desencadeou-se um aumento da criação de aves em confinamento, levando alguns produtores elevar a quantidade de aves por metro quadrado dentro do galpão. Além disso, o aumento do número de lotes com o reaproveitamento da cama e intervalo entre lotes reduzido, também tem contribuído com a multiplicação de micro-organismos patogênicos e o aumento populacional de insetos, uma vez que encontram habitat ideal devido a temperatura e ao incremento da umidade da cama aviária, proveniente tanto das excretas das aves, como da água dos bebedouros (REZENDE, 2009; MENDES & POVALUK, 2017).

Outro fator importante é que estes insetos possuem uma grande quantidade de alimento disponível, tendo em vista que se alimentam de restos de rações, excretas e eventualmente carcaças das aves em decomposição (MCALLISTER et al.1995; PACHECO & PAULA 1995). Quando inseridos no galpão aviário, trazem consigo diversos prejuízos para o sistema sejam eles pela queda de desempenho das aves por estresse, por lesões no TGI das aves devido à ingestão de larvas ou insetos adultos que pode transmitir verminoses e também pode interferir no consumo de ração balanceada ou agir como vetor de agentes causadores de doenças, onde se destacam a Doença de Marek, Leucose Aviária, Coccidioses, Salmonelose, Clostridiose por *Clostridium perfringens*, Newcastle, Influenza Aviária e Doença Bursal Infecciosa (AVANCINI & UETA, 1990; DESPINS et al., 1994; DESPINS & AXTELL, 1995; MATIAS, 2005; VITTORI et al., 2007).

Além disso, quando a umidade da cama do aviário está muito baixa e há infestação de cascudinho, estes tendem a se alojar nas penas das aves, provocando estresse e lesões na pele, resultando também na condenação das carcaças no abate (OUROFINO, 2011). Outro fato que pode levar ao descarte das carcaças nos abatedouros citado por Chernaki-Leffer et al. (2001) é a contaminação quando os insetos são extraídos do papo e da moela.

Japp et al. (2010) apontam também os danos provocados nas instalações avícolas quando o cascudinho se encontra na fase larval, uma vez que estes escavam túneis no material isolante para realizar ecdise e acabam danificando a proteção de poliuretano utilizada no isolamento térmico dos aviários em países de clima frio, tornando necessária sua troca a cada dois ou três anos.

4.4 Métodos de controle

Medidas de controle tornam-se necessárias, no entanto, os hábitos do inseto e o intervalo entre os lotes nos galpões cada vez mais reduzido dificultam as práticas de medidas de controle, principalmente aquelas que se baseiam no uso de produtos químicos, físicos e mecânicos.

4.4.1 Controle Químico

O controle tradicional dessa praga consiste na utilização de produtos químicos, como, por exemplo, os piretroides e organofosforados. Porém, estes apresentam diversas desvantagens, tais como resistência individual de insetos, contaminação do ambiente das aves, exposição dos avicultores a produtos nocivos à saúde e a contaminação das carcaças com resíduos químicos provenientes dos tratamentos. Chernaki-Leffer et al. (2011) observaram baixa eficácia dos inseticidas sintéticos cipermetrina e diclorvós no controle do cascudinho. Além disso, existe uma grande barreira comercial para exportação da carne, uma vez que vários países não permitem o uso de determinados produtos químicos na cadeia de produção, pois estes podem deixar resíduo na carcaça (JAPP et al., 2010).

4.4.2 Controle Físico e Mecânico

O ciclo biológico do cascudinho está diretamente relacionado à temperatura e umidade da cama nos aviários. Chernaki e Almeida (2001) observaram que o tempo de desenvolvimento das suas fases aumenta a uma temperatura de 22°C, porém, a sobrevivência é baixa. E seus estudos revelaram também que a temperatura de 31°C foi considerada a mais propícia para o desenvolvimento das fases larvais, com altos índices de sobrevivência. Além disso, temperaturas inferiores a 16,5°C podem contribuir eficientemente no controle do cascudinho, uma vez que a esta temperatura não ocorre o desenvolvimento das fases larvais e eclosão dos ovos, o que leva a uma redução na população.

Com relação ao controle mecânico, este consiste no manejo do galpão após a retirada dos lotes. Em regiões de clima temperado, utiliza-se no inverno a abertura das cortinas que matam as larvas pelo frio. Outro modo importante e largamente utilizado, principalmente no Brasil, é o amontoamento e cobertura da cama com uma lona após a saída do lote e sua manutenção durante todo o vazio sanitário, isso ocasiona o aumento da temperatura e a liberação de amônia, o que também desencadeia a morte das larvas e dos insetos adultos (MENDES & POVALUK, 2017).

Ainda segundo os autores Mendes e Povaluk (2017), este procedimento é utilizado também no controle dos coccídeos e auxilia na redução da população dos cascudinhos, porém, de forma isolada não tem produzido resultados satisfatórios, sendo comum a associação dos tratamentos químicos e mecânicos visando maximizar sua eficiência, mas devido a grande quantidade de matéria orgânica e as características estruturais dos galpões aviários, estes métodos ainda assim são ineficientes no controle desta praga.

4.4.3 Controle Biológico

Estudos têm sido desenvolvidos com intuito de estabelecer um método alternativo e que possa integrar os métodos convencionais de tratamento nas diversas áreas da parasitologia. Entre eles se destacam os tratamentos biológicos. Entre estes a utilização de nematóides (ALVES et al. 2005) e fungos entomopatogênicos (ROHDE et al., 2006; LUCKMANN et al., 2010) no controle do cascudinho.

Além dos trabalhos realizados com o cascudinho, existem estudos utilizando o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, como alternativa de controle biológico sobre diversos artrópodes de interesses agrícolas e pecuários destacando-se os percevejos das pastagens do gênero *Deois* (PEREIRA et al., 2008), da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (ALVES, 1998), da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, (OLIVEIRA et al., 2008) e carrapatos de impacto na pecuária, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SILVA et al., 2010).

4.5 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentoso, entomopatogênico, que tem capacidade de infectar e matar cerca de 300 diferentes espécies de insetos e artrópodes (ROBERTS & ST. LEGER, 2004).

O seu desenvolvimento ocorre de maneira vegetativa, normalmente em temperaturas entre 15 e 32°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento varia de 24 a 30°C e pH 6,9, com tolerância a um intervalo relativamente alto do pH de 2,0 a 8,5 (ARRUDA et al., 2005).

A infecção pelo fungo *M. anisopliae* é complexa e ocorre através da penetração direta da cutícula dos artrópodes. Isto depende de fatores ambientais e do metabolismo da célula, esquematicamente pode ser dividido em adesão, germinação, formação de apressório, formação de grampo de penetração, penetração propriamente dita, colonização, reprodução do patógeno e disseminação (ARRUDA et al., 2005).

A adesão do fungo depende diretamente da topologia e da constituição química da cutícula do artrópode (LORD & HOWARD, 2004; SOSA-GOMEZ et al., 1997). Os conídios possuem proteínas apolares em sua superfície, as hidrofobinas, que são responsáveis por fazer a comunicação entre eles e a camada lipídica presentes na superfície dos hospedeiros, desta forma permitindo a adesão (FAN et al., 2007; ST. LEGER et al., 1992).

Assim, a utilização das formulações comerciais a base de conídios de *M. anisopliae*, usualmente comercializadas em forma de pó e diluídas em soluções

aquosas, podem ser otimizadas com o incremento de óleo vegetal, com intuito de aumentar a camada lipídica presente na cutícula dos artrópodes facilitando a adesão dos conídios, uma vez que estes são lipofílicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção e sexagem de *A. diaperinus*

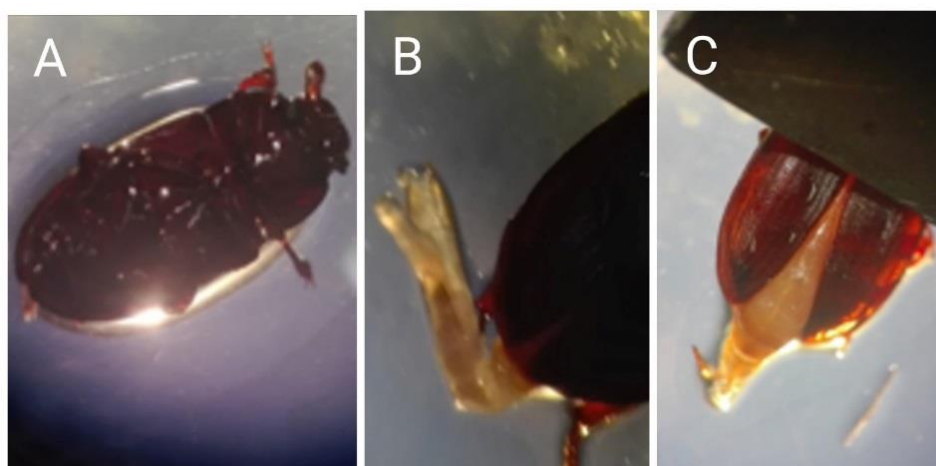
Os insetos utilizados na pesquisa foram obtidos através de coleta manual, em um galpão aviário, localizado na zona rural do município de Governador Mangabeira, Bahia, Brasil localizada a 12°35'46.2" SUL 39°04'09.4" OESTE. Posteriormente, foram levados ao LPDP – HUMV, onde foram separados da cama e selecionados 360 insetos adultos, com mesmo tamanho e visivelmente saudáveis, sendo estes 180 machos e 180 fêmeas. A sexagem foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópio e teve como critério a coloração do tegumento, marrom nos machos e preto nas fêmeas (Figura 1) e exposição do aparelho reprodutivo dos insetos (Figura 2) (CHERNAKI & ALMEIDA, 2001).

Figura 1 - Diferenciação sexual através da coloração do tegumento.



Fonte: Acervo Pessoal (2018)

Figura 2 - Exposição da genitália de *Alphitobius diaperinus* para diferenciação sexual



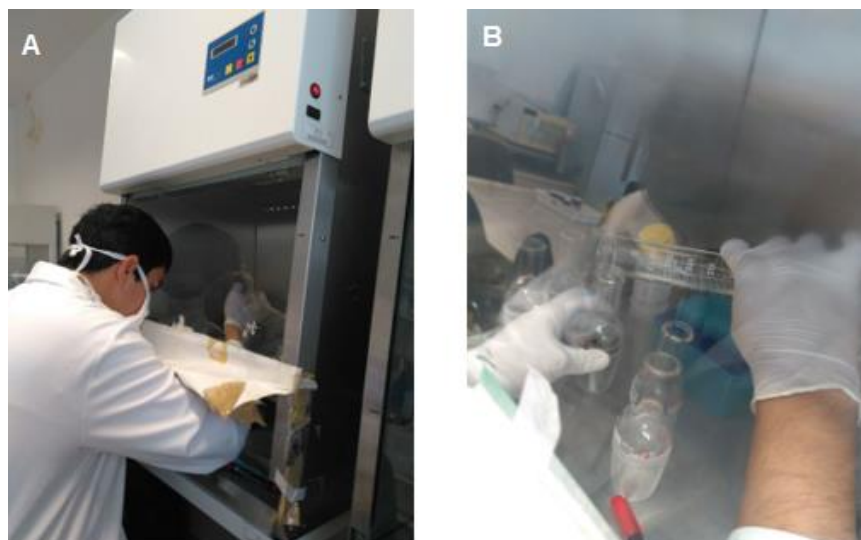
A) Visão ventral do inseto; B) Genitália da fêmea; C) Genitália do macho
Fonte: Acervo Pessoal (2018)

Inicialmente, as placas de Petri foram devidamente higienizadas com detergente neutro e secas com o auxílio de papel toalha, em seguida cada placa foi montada com papel filtro e 4g de ração comercial para frangos. Estas foram fechadas, embaladas em sacos de autoclave e autoclavadas a 121°C/30 minutos.

5.2 Preparo das formulações aquosas e oleosas

Para preparar as formulações utilizadas nos ensaios, inicialmente foi produzida em capela de fluxo contínuo esterilizada com luz ultravioleta por 15 minutos, uma solução inicial que foi preparada com 100mL de água destilada estéril, 4μL de Tween 20 e 5g de Metarril E9 WP Organic® (Figura 3), esta solução foi preparada afim de padronizar os tratamentos contendo o fungo. Em seguida uma alíquota foi quantificada em câmara de Neubauer e microscópio óptico, cuja concentração encontrada foi de $1,18 \times 10^8$ conídios/ml. A partir desta solução inicial, obteve-se as formulações aquosa e oleosas contendo óleo vegetal (Figura 4).

Figura 3 –Preparo da solução inicial da formulação de Metarril E9 WP Organic®



A) Visão externa da capela de fluxo; B) Visão interna da capela de fluxo

Fonte: Acervo Pessoal (2018)

Figura 4 - Formulações aquosas e oleosas dos grupos controle e com Metarril E9 WP Organic®



Fonte: Acervo Pessoal (2018)

Foram utilizados seis balões de vidro estéreis de 50 ml, proveta graduada estéril e micropipetadores com ponteiros estéreis. As soluções foram preparadas de acordo com a Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Descrição dos grupos de tratamento e suas composições

T1 CTR H₂O	T2 CTR ÓLEO 9,09%	T3 CTR ÓLEO 4.76%	T4 METARRIL E9	T5 METARRIL E9 + ÓLEO 9,09%	T6 METARRIL E9 + ÓLEO 4,76%
30ml de H ₂ O destilada.	30ml de H ₂ O destilada.	30ml de H ₂ O destilada.	30mL de solução inicial.	30mL de solução inicial.	30mL de solução inicial
	1,2µL tween 20	1,2µL tween 20		3mL de óleo	1,5mL de óleo
	3ml de óleo	1,5ml de óleo			

Fonte: Autor, 2018.

5.3 Delineamento experimental e ensaio biológico

Após a sexagem, os insetos foram separados em três grupos de tratamento e três grupos de controle. Cada grupo contendo seis placas com cinco casais de adultos em cada, totalizando 60 insetos por grupo.

O tratamento foi realizado através da imersão dos casais em tubos de ensaio contendo cinco mL das soluções respectivas de cada grupo, sendo seis tubos por grupo, estes permaneceram imersos por cinco minutos em agitação manual, após esse processo os insetos foram retirados com o auxílio de uma peneira e colocados em suas respectivas placas montadas e identificadas. Esta metodologia foi adaptada do trabalho de Camargo et al. (2014)

Após o acondicionamento dos casais em suas respectivas placas e grupos, as mesmas foram acondicionadas em estufa BOD climatizada com temperatura e umidade controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\% \pm 5\% \text{ UR}$) (Figura 5), e monitoradas a cada três dias até o 12° dia. O parâmetro observado foi o percentual de mortalidade.

Figura 5 - Placas contendo os insetos após o tratamento na estufa BOD climatizada $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $80\% \pm 5\%$ UR.



Fonte: Acervo Pessoal (2018)

5.4 Análise estatística

As médias dos tratamentos foram comparadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Os dados foram analisados usando o software *Instat 3.0*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como resultados pode-se observar que a formulação aquosa do produto comercial de *M. anisopliae* não causou mortalidade significativa nos adultos de *A. diaperinus* quando comparada aos controles aquosos (Tabela 2). O grupo controle de formulação aquosa (Controle H₂O), não apresentou mortalidade expressiva como já era esperado, o que indica que as condições de alimentação, temperatura e umidade nas placas foram adequadas para a sobrevivência dos insetos.

Tabela 2 - Média \pm desvio padrão do número de adultos de *Alphitobius diaperinus* mortos após o tratamento com formulações aquosas e oleosas de Metarril E9 WP Organic® em condições *in vitro*, do dia zero até o 12º dia pós tratamento.

Tratamentos	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12
Controle H2O	0,17 \pm 0,41 a	0,17 \pm 0,41 a	0,17 \pm 0,41 a	0,17 \pm 0,41 A	0,17 \pm 0,41 A
Controle óleo 4,76%	8,33 \pm 1,17 b	8,33 \pm 1,17 b	8,33 \pm 1,17 b	8,33 \pm 1,17 b	8,33 \pm 1,17 B
Controle óleo 9,09%	10,0 \pm 0,00 b	10,0 \pm 0,00 b	10,0 \pm 0 b	10,0 \pm 0,00 b	10,0 \pm 0 b
Formulação H2O	0,17 \pm 0,41 a	0,17 \pm 0,41 a	0,17 \pm 0,41 a	0,50 \pm 0,55 a	0,87 \pm 0,62 A
Formulação óleo 4,76%	10,0 \pm 0,00 b	10,0 \pm 0,00 b	10,0 \pm 0 b	10,0 \pm 0,00 b	10,0 \pm 0,00 B
Formulação óleo 9,09%	8,86 \pm 2,86 b	8,86 \pm 2,86 b	8,86 \pm 2,86 b	8,86 \pm 2,86 b	8,86 \pm 2,86 B

(*) Média \pm desvio padrão seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

De acordo com estudos prévios utilizando suspensões aquosas de *M. anisopliae* sobre artrópodes susceptíveis, o tempo médio da infecção à mortalidade é em torno de sete dias (ARRUDA et al., 2005; PERINOTTO et al., 2014). Este tempo é necessário devido à forma de infecção, etapas de crescimento e proliferação fúngica nos artrópodes.

Utilizando formulação aquosa no presente estudo, foi observado apenas a mortalidade de quatro insetos adultos no 12º dia após o tratamento. Diferindo dos resultados aqui encontrados, Luckmann et al. (2010), observaram que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* em solução aquosa causou 100% de mortalidade nas fases larvais de *A. diaperinus*. Essa diferença pode ser explicada pela maior sensibilidade do estágio larval quando comparado com os adultos, visto que em estudos sobre adultos Rhode et al. (2006) observaram mortalidade variando entre 0 e 86,7% após tratamento com o entomopatógeno, porém neste estudo os autores utilizaram isolados fúngicos obtidos de diferentes artrópodes o que explica a variação encontrada nos resultados.

Com relação aos grupos que continham óleo na composição foi observado um percentual elevado de mortalidade em todos os grupos, sendo

todos significativamente maiores do que os grupos aquosos. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos oleosos e os seus respectivos grupos controle (Tabela 2).

Vale ressaltar que este foi o primeiro trabalho utilizando formulação comercial de *M. anisopliae* com adição de óleo vegetal sobre *A. diaperinus*. Estudos similares, porém, com outros artrópodes já foram realizados, como por exemplo, a pesquisa realizada por Camargo et al. (2014) utilizando formulação comercial de conídios do fungo *M. anisopliae* contendo 10% de óleo mineral sobre o carrapato *R. (B.) microplus*, que obtiveram eficácia de até 50,19% na primeira semana após o tratamento.

Um dos principais entraves da utilização dos fungos entomopatogênicos a campo é a sensibilidade destes organismos às intempéries ambientais, principalmente a radiação solar, temperatura e umidade (ALVES, 1998). Para minimizar a influência desses fatores, a utilização de formulações é fundamental. Trabalhos prévios foram realizados visando avaliar a eficiência dos fungos artropodopatogênicos associados a óleos, como o experimento de Kaaya e Hassan (2000) que avaliaram a ação dos fungos *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* em suspensão aquosa e formulação a base de óleo de amendoim, sobre todos os estágios de desenvolvimento dos carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum*, em testes *in vivo*.

Estes autores observaram 100% de mortalidade em larvas, de 80% a 100% em ninfas e de 80% a 90% em adultos de ambas as espécies de carrapato tratadas com a formulação oleosa dos dois isolados fúngicos citados acima. A suspensão aquosa também provocou mortalidade, porém significativamente menor quando comparada à formulação oleosa.

Um fator relevante que ocorreu no experimento foi que no momento da imersão dos insetos nas formulações oleosas, tanto dos grupos controle quanto das fúngicas, foi verificado a morte imediata dos insetos.

Os efeitos tóxicos de veículos ou adjuvantes utilizados em formulações fúngicas já foram relatados anteriormente sobre os artrópodes alvos. Abdel Shafty e Soliman (2004) testaram o efeito tóxico dos óleos essenciais das plantas *Lavandula officinalis*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Marjorana*

hortensis e *Mentha viridis* contra ovos embrionados, larvas não alimentadas e fêmeas alimentadas do carrapato *Rhipicephalus annulatus* (= *Boophilus annulatus*), e verificaram que os óleos essenciais das plantas testados possuem efeito tóxico em todos os estágios de desenvolvimento de deste artrópode.

Os óleos vegetais e minerais vêm sendo testados como adjuvantes em formulações fúngicas (PERINOTTO et al., 2017). A utilização destes produtos tem como objetivos facilitar a adesão dos conídios à superfície dos artrópodes e concomitantemente protege-los da ação da radiação ultravioleta (SOUZA, 2003). Além disso, as formulações fúngicas contendo óleos apresentam outros fatores favoráveis, como um menor efeito evaporativo sobre o produto aplicado, propriedades quitinofílicas incrementando a adesão e infectividade e propicia maior período de armazenamento do produto formulado quando comparado às suspensões aquosas (PRIOR et al., 1988).

Ainda em estudos realizados com carrapatos foi observado que as formulações de Metarril WP Organic® contendo 1, 3 ou 5 % de óleo mineral também foram eficientes contra ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos em condições de laboratório (MARCIANO et al., 2013), embora não tenha sido relatada morte imediata dos artrópodes durante o tratamento como observado no presente estudo.

Pouco se sabe sobre o efeito inseticida do óleo vegetal de soja sobre *A. diaperinus* e seu mecanismo de ação. Diante disso devido a mortalidade imediata dos insetos quando imersos nas formulações oleosas, infere-se que o óleo possa ter obstruído o opérculo respiratório dos insetos causando asfixia. Todavia, há na literatura estudos utilizando outros tipos de óleos, como por exemplo, um estudo recente realizado por Volpato et al. (2018) que avaliaram o efeito inseticida de diferentes óleos essenciais sobre *A. diaperinus*, e como resultados observaram pouco efeito deletério. Entretanto, vale ressaltar que a metodologia de exposição dos cascudinhos aos óleos foi diferente entre o experimento supracitado com o do presente trabalho, sendo que no trabalho de Volpato et al. (2018) os autores colocaram os insetos em placas contendo papel filtro com óleo essencial, enquanto que no presente estudo os cascudinhos foram imersos nas formulações oleosas e além disso há um

diferença funcional entre os óleos, o vegetal tem função protetora para os conídios e de aumentar a adesão deles a cutícula do inseto. Outra diferença está relacionada a estrutura química do óleo vegetal quando comparado aos óleos essenciais, que por sua vez tem função fitotóxica.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados é possível concluir que o óleo vegetal de soja apresenta letalidade para insetos adultos de *A. diaperinus* e que a formulação comercial de *M. anisopliae* sem a adição de óleo vegetal não apresentou ação patogênica para esse inseto na fase adulta. Porém, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer o mecanismo de ação do óleo vegetal sobre o cascudinho.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SHAFY, S.; SOLIMAN, M. M. M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (acari: ixodida: amblyommidae) infesting cattle in Egypt. **Acarologia**, v. 44, p. 23-30, 2004.

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Exportação no ano de 2017. Disponível em <<http://abpa-br.com.br/noticia/receita-das-exportacoes-de-carne-de-frango-encerra-2017-com-alta-de-57-2298>>. Acesso em 28 de junho de 2018.

ALVES, L.F.A; ROHDE, C.; ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 139-141, 2005.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano e insetos. Piracicaba: **FEALQ**, p.289-381, 1998.

ARENDS, J.J. Control, management of the litter beetle. **Poultry Digest.**, Mount Morris, v.44, p.172-176, 1987.

ARRUDA, W. Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. 2005.

ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental & applied acarology**, v. 37, n. 3-4, p. 231-244, 2005.

AVANCINI, R.M.P.; UETA, M.T. Manure breeding insects (Diptera and Coleoptera) responsible for cestoidosis in caged layer hens. **Journal of Applied Entomology**, v. 110, n. 1-5, p. 307-312, 1990.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, p. 351-354, 1999.

CAMARGO, Mariana G. et al. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 271-276, 2014.

CEPEA, Esalq-USP - FRANGO/PERSPEC 2018: COM EXCEDENTE, SETOR DEPENDERÁ DE BOM DESEMPENHO DAS EXPORTAÇÕES. Disponível em <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/frango-perspec-2018-com-excedente-setor-dependera-de-bom-desempenho-das-exportacoes.aspx>>.

Acesso em 26 de junho de 2018.

CHERNAKI, A.M.; ALMEIDA, L.M. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.365-368, 2001.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; LAZZARI, F. A.; LAZZARI, S. M. N.; ALMEIDA, L. M. Controle do cascudinho. **Avicultura Industrial**, 92 (1094). São Paulo, p. 22-25, 2001.

DAI PRA, M. A.; ROLL, V. F. B. Cama de aviário: utilização, reutilização e destino. **Porto Alegre: Manas/Evangraf**, 2012.

DELIBERALI, E. et al. Exportações e habilitações de carne de frango ao mercado internacional: um estudo da mesorregião oeste do Estado do Paraná. **Informações Econômicas**, v. 40, n. 6, jun. 2010.

DESPINS, J.L.; AXTELL, R.C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Poultry Science**, v.74, p.331-336, 1995.

DESPINS, J.L.; AXTELL, R.C; RIVES, D.V.; GUY, J.S.; FICKEN, M.D. Transmission of enteric pathogens of turkeys by darkling beetle larva (*Alphitobius diaperinus*). **Journal of Applied Poultry Research**, v. 3, n. 1, p. 61-65, 1994.

EVANS, D. E. The influence of some biological and physical factors on the heat tolerance relationships for *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Bostrychidae and Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 17, n. 2, p. 65-72, 1981.

FAN, Y.; Fang, W.; Guo, S.; Pei, X.; Zhang, Y.; Xiao, Y., ... & Pei, Y. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 295-302, 2007.

GEDEN, C.J.; ARENDS, J.J.; RUTZ, D.A.; STEINKRAUS, D.C. Laboratory Evaluation of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in Poultry Litter, Soil, and a Pupal Trap. **Biological Control**, v. 13, n. 2, p. 71-77, 1998.

GIROTTI, A.F.; AVILA, V.S. **Produção Frangos de Corte**: importância econômica. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/SP/aves/Importancia-economica.html>>. Acesso em: 28/06/2018 as 18:14 horas.

JAPP, A.K.; BICHO, C.L.; SILVA, A.V.F. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, jul. 2010.

KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 913–926, 2000.

LEGNER, E.F.; OLTON, G.S. Worldwide survey and comparison of adult predator and scavenger insect populations associated with domestic animal manure where livestock is artificially congregated. **Hilgardia**, Berkeley, n. 40, p.225- 256, 1970.

LESCHEN, R.A.B.; STEELMAN, D.D. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larva and adult mouthparts. **Entomology News**, v. 99, p. 221-224, 1988.

LORD, J. C.; HOWARD, R. W. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. **Mycopathologia**, v. 158, n. 2, p. 211-217, 2004.

LUCKMANN, D.S.; GOUVEA, A.S.; PIZZATTO, M.S.; PEGORINI, C.S.; SIMIONATO, S.S.; SMANIOTTO, L.S.; POTRICH, M. EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE CASCUDINHO *Alphitobius diaperinus*

(PANZER)(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). **Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária-Ciências Agrárias, Animais e Florestais**, 2010.

MARCIANO, Allan Felipe et al. EFICIÊNCIA in vitro DE UMA FORMULAÇÃO OLEOSA DE *Metarhizium anisopliae* SENSU LATO NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. Supl. 2, p. 28-34, 2013.

MATIAS, R. S. Controle de *Alphitobius diaperinus* com inseticidas piretróides e organofosforados em granjas avícolas no sul do Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 25, n.148, p. 47-51, 2005.

MCALLISTER, J.C.; STEELMAN, C.D.; NEWBERRY, L.A.; SKEELES, J.K. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **Poultry Science**, v. 74, n. 1, p. 45-49, 1995.

MENDES, L. R.; POVALUK, M. Ciclo e controle do *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) no Município de Quitandinha, PR. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 6, n. 1, p. 107-122, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/importacao-e-exportacao/>>. Acesso em 09 de agosto de 2018.

OLIVEIRA, M. A. P.; MARQUES, E. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; BARROS, R. Efeito de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorok. Sobre características biológicas de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

OUROFINO, Programa de Manejo Integrado para o Controle de Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) em aviários. Ribeirão Preto, 2011.

PACHECO, I. A.; PAULA, D. C. Insetos de grãos armazenados: Identificação e biologia. Campinas: **Fundação Cargill**, 228p, 1995.

PAIVA, D. P. Cascudinho: biologia. **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AVICULTURA**, p. 133-139, 2000.

PEREIRA, M. F. A.; BENEDETTI, R. A. L.; ALMEIDA, J. E. M. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (Stal.,1854), em pastagem de capim (*Brachiaria decumbens*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4 , p. 465-469, 2008.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, SIMONE; SA, F. A.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A. F.; MONTEIRO, C. M. O.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *In vitro* pathogenicity of different *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates in oil formulations against *Rhipicephalus microplus*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 27, p. 338 - 347, 2017.

Perinotto W.M.S., Angelo I.C., Gôlo P.S., Camargo M.G., Quinelato S., Santi L., Vainstein M.H., Beys da Silva W.O., Salles C.M.C. & Bittencourt V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: Biochemical marker of fungal virulence in (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**. v. 24, p. 123-132, 2014.

PREISS, F.J. & J.A. DAVIDSON. Characters for separating late-stage larvae, pupae, and adults of *Alphitobius diaperinus* and *A. laevigatus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, n. 3, p. 807-808, 1970.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P., LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera:Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 66–72, 1988.

RELATÓRIO ANUAL DA ABPA 2017. Disponível em <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em 26 de junho de 2018.

REZENDE, S.R.F. **Fungos Entomopatogênicos no Controle do *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) como Estratégia de Biossegurança na Avicultura**. 2009. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Zootecnia. UFRRJ. Seropédica-RJ, 2009.

ROBERTS, D. W.; ST LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insectpathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 54, p. 1-70, 2004.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; SILVA, E.D.; ALMEIDA, J.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.

SILVA, A.S. da; HOFF, G.; DOYLE, R.L.; SANTURIO, J.M.; MONTEIRO, S.G. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.2, p.177-181, 2005.

SILVA, W.O.B.D.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* infection. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, p. 10-15, 2010.

SOSA-GOMEZ, D. R.; BOUCIAS, D. G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, n. 1, p. 31-39, 1997.

SOUZA, E. J.; **Avaliação da eficácia de bioacaricidas a base de fungos entomopatogênicos, em diferentes formulações, no controle dos carrapatos *Anocentor nitens* e *Boophilus microplus***. 2003. 56 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2003.

STEELMAN, D. Darkling beetles are costly pests. **Poultry Digest**, v. 55, p. 22-23, 1996.

ST. LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 120, n. 1, p. 119-124, 1992.

TINÔCO, I. F.F. Avicultura industrial: Novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.1-26, 2001.

VERGARA, C.; GAZANI, R. Biologia de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Peruana de Entomologia**, v.39, p.1-5, 1996.

VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; TROVÓ, K.P.; RIBEIRO, C.A.M.; BARBOSA, G.G.; SOUZA, L.M.D.; PIGATTO, C.P. *Alphitobius diaperinus* spp como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista-Brasil. **Ciência Rural**, p. 894-896, 2007.

VOGADO, Gleissa Mayone Silva et al. Evolução da avicultura brasileira. **Nucleus Animalium**, v. 8, n. 1, p. 49-58, 2016.

VOLPATO, Andreia et al. AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS INSETICIDA E LARVICIDA DE OITO ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O CASCUDINHO AVIÁRIO (*Alphitobius diaperinus*). **Archives of Veterinary Science**, v. 23, n. 2, 2018.