

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS  
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO

ANA ELISABETH KORTE STEIN

---

***Bacillus thuringiensis* para controle de *Musca domestica*:  
Seleção de estirpes e avaliação do perfil de hemócitos em  
larvas**

---

Goiânia  
2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS  
DE TESES E  
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      ☒ **Dissertação**      ☐ **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

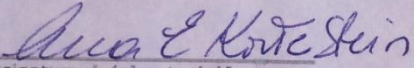
Nome completo do autor: Ana Elisabeth Korte Stein

Título do trabalho: *Bacillus thuringiensis* para controle de *Musca domestica*: Seleção de estirpes e avaliação do perfil de hemócitos em larvas

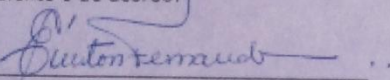
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM**      ☐ **NÃO**<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Prof. Dr. Everton Kari Kamp Fernandes  
Universidade Federal de Goiás - UFG  
IPTSP / DMIPP Mat. 432933

Data: 01 / 10 / 2017

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

**ANA ELISABETH KORTE STEIN**

---

***Bacillus thuringiensis* para controle de *Musca domestica*:  
Seleção de estirpes e avaliação do perfil de hemócitos em  
larvas**

---

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro  
da Universidade Federal de Goiás para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biologia das Relações Parasito-  
Hospedeiro.

Orientador: Everton Kort Kamp  
Fernandes

Co-orientador: Rose Gomes Monnerat  
Solon de Pontes

**Goiânia  
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Korte Stein , Ana Elisabeth

*Bacillus thuringiensis* para controle de *Musca domestica*: Seleção de estirpes e avaliação do perfil de hemócitos em larvas [manuscrito] / Ana Elisabeth Korte Stein . - 2017.  
59 f.

Orientador: Prof. Dr. Everton Kort Kamp Fernandes ; co orientadora Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Bacillus thuringiensis* . 2. *Musca domestica* . 3. Hemócitos . I. Kamp Fernandes , Everton Kort , orient. II. Título.

CDU 576.8



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANA ELISABETH KORTE STEIN** - Aos vinte e oito dias do mês de junho do ano de 2017 (28/06/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES, ISABELE DA COSTA ANGELO e CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E O EFEITO DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO SOBRE HEMÓCITOS DE LARVAS DE *MUSCA DOMESTICA*”**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de ANA ELISABETH KORTE STEIN, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. ÉVERTON KORT KAMP FERNANDES que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes  
Prof. Dra. Isabele da Costa Angelo  
Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro

**Aprovada / Reprovada**

APROVADA

APROVADA

Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA, (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 25 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.  
A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

*Bacillus thuringiensis* para controle de *Musca domestica* : seleção de estirpes e avaliação do perfil de hemócitos em larvas.

Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP/UFG)  
Prof. Dra. Isabele da Costa Angelo (UFRRJ/RJ)  
Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro (IPTSP/UFG)  
Secretário da Pós-Graduação:

**Assinatura**

Éverton Kort Kamp Fernandes  
Isabele da Costa Angelo  
Caio Márcio de Oliveira Monteiro  
Kariny Vieira Soares e Silva

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico aos meus filhos Rafael, Beatriz e  
André e ao meu marido Dino Chaitz Stein.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Éverton Kort Kamp Fernandes pela oportunidade de trabalhar nesta Instituição e neste laboratório que muito me ensinaram e engrandeceram.

Agradeço também a Dra. Rose que abriu as portas de seu laboratório para que parte desse trabalho fosse realizado, abrindo também meu horizonte para uma outra área de atuação.

Ao meu marido Dino e meus filhos Rafael, Beatriz e André que apoiaram e compreenderam os momentos de ausência.

Aos meus pais, Gustavo e Elisabeth que desde cedo me ensinaram que o verdadeiro tesouro está no conhecimento, nos estudos e principalmente no esforço pessoal.

A todos os colegas de laboratório que tiveram muita paciência, amizade e dedicação ao me ensinar muito do que aprendi nesses anos de convivência.

A Ester Yoshie Yosino, da Embrapa Cenargen, que muito me ajudou e me ensinou.

Ao professor Caio Márcio de Oliveira Monteiro, pela paciência e por toda a orientação ao longo desse período.

## SUMÁRIO

---

SUMÁRIO.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 <i>Musca domestica</i> .....	17
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	21
2.3.1.Morfologia e Fisiologia .....	21
2.3.3.Ecologia .....	22
2.4Sistema imunológico de <i>M. domestica</i> .....	27
3. JUSTIFICATIVA .....	29
4. OBJETIVOS .....	31
4.1Objetivo geral .....	31
4.2 Objetivos específicos .....	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1Criação de <i>Musca domestica</i> .....	32
5.2 Estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> estudadas.....	33
5.3Bioensaios.....	34
5.3.1 Seleção de estirpes tóxicas .....	34
6. RESULTADOS .....	42
6.1Seleção de estirpes tóxicas .....	42
6.2Bioensaio para cálculo de Eficácia do Tratamento Larval .....	42
6.3Caracterização morfológica de hemócitos.....	44
6.4Efeitos de <i>B. thuringiensis</i> no perfil de hemócitos de hemolinfa de larvas de <i>M. domestica</i> . .....	46
7. DISCUSSÃO .....	49
8. CONCLUSÃO.....	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1-</b> Morfologia de <i>Musca domestica</i> .....	17
<b>Figura 2-</b> Estágios de desenvolvimento de <i>Musca domestica</i> . ....	18
<b>Figura 3-</b> Utensílios utilizados na criação de <i>Musca domestica</i> .....	32
<b>Figura 4-</b> Seleção de estirpes tóxicas.....	34
<b>Figura 5-</b> Teste de Eficiência do Tratamento larval.....	35
<b>Figura 6-</b> Coleta de hemolinfa .....	36
<b>Figura 7-</b> Método de coloração Giemsa.....	37
<b>Figura 8-</b> Contagem Total de células.....	38
<b>Figura 9-</b> Mortalidade média das larvas L3 de <i>Musca domestica</i> tratadas com 22 estirpes de <i>B. thuringiensis</i> .....	40
<b>Figura 10-</b> Hemócitos da hemolinfa de larvas de <i>Musca domestica</i> corados com Giemsa.....	43
<b>Figura 11-</b> Contagem de células totais da hemolinfa de larvas de <i>M. domestica</i> .....	44
<b>Figura 12-</b> Contagem diferencial dos hemócitos de larvas de <i>Musca domestica</i> .....	45
<b>Figura 13-</b> Tamanho celular.....	46

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Descrição das toxinas Cry produzidas pela bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> e seus genes codificadores (Monnerat 2006).....	24
<b>Tabela 2.</b> Siglas das estirpes testadas, variedade e origem.....	33
<b>Tabela 3.</b> Mortalidade larval, mortalidade de pupas e eficácia do tratamento larval em larvas de <i>Musca domestica</i> tratadas com diferentes doses de <i>Bacillus thuringiensis</i> estirpe S601 e S599.....	41
<b>Tabela 4.</b> Proporção núcleo/citoplasma de hemócitos de larvas de <i>Musca domestica</i> ...	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

LPI	Laboratório de Patologia de Invertebrados
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
UFG	Universidade Federal de Goiás
°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de Variância
SNK	Student-Newman-Keuls
ppm	Parte por milhão
mg	Miligramma
g	Gramas
%	Porcentagem
mm	Milímetro
$\delta$	Delta
<i>Vip</i>	Vegetative Insecticidal Protein
<i>PCR</i>	Reação em cadeia de Polimerase
<i>kDa</i>	Kilodalton
<i>RNA</i>	Acido ribonucléico
<i>UR</i>	Unidade Relativa
ml	Mililitro
ETL	Eficiência do tratamento larval
$\mu\text{m}$	Micrômetro

*Musca domestica* é considerada uma das pragas mais prejudiciais à produção intensiva de aves poedeiras devido seu alto poder reprodutivo e elevado potencial de agir como vetor mecânico de vários agentes causadores de doenças. Atualmente a sociedade vem procurando novas formas de controle de pragas, já que o uso constante e indiscriminado de produtos químicos tem levado a casos de intoxicação em humanos e animais, além de selecionar populações cada vez mais resistentes, deixar resíduos no ambiente e nos alimentos e prejudicar insetos importantes para o equilíbrio biológico. No intuito de desenvolver outra forma de controle para *M. domestica*, o presente trabalho selecionou estirpes de *Bacillus thuringiensis* promissoras para atuarem como agentes de biocontrole de *M. domestica*. Dessa forma, no teste seletivo foram testadas 22 estirpes de *B. thuringiensis*, onde duas mostraram-se virulentas para larvas da mosca. Bioensaios para determinação de eficácia do tratamento larval foram realizados e as estirpes testadas (S601 e S599) mostraram-se promissoras para o controle de larvas de *M. domestica* em todas as concentrações testadas (20; 15; 10; 5; 1; 0,5; 0,25; 0,125mg/g). Em outra etapa, o estudo caracterizou os hemócitos da hemolinfa de larvas de *M. domestica* por identificação e quantificação dos tipos celulares presentes na hemolinfa, estudou ainda o efeito do tratamento com a estirpe S599 de *B. thuringiensis* na contagem total das células, contagem diferencial celular e no tamanho das células, utilizando-se para esta finalidade a microscopia ótica. Realizou-se coletas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 hrs. Foram encontrados cinco tipos celulares: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, oenocitoides e esferulócitos, sendo os plasmatócitos as células em maior número, os pró-hemócitos as menores células encontradas e os oenocitoides as maiores células encontradas. O tratamento com *B. thuringiensis* não alterou as características morfológicas dos hemócitos, assim como não alterou a contagem diferencial das células; no entanto, o número total de hemócitos na hemolinfa aumentou significativamente 48 horas após tratamento das larvas. As estirpes de *B. thuringiensis* selecionadas são possíveis agentes de biocontrole de *M. domestica*.

## ABSTRACT

---

*Musca domestica* is considered one of the most harmful pests to the egg industry due to its high reproductive capacity and great potential of acting as a mechanical vector of many pathogenic agents to the egg-laying hens. Currently, the society is interested in alternative methods for pest control, once the constant and indiscriminate use of chemical products has caused intoxication to humans and domestic animals. Also, the irregular use of chemicals has selected resistant fly populations, accumulated chemical residues in the environment and food, and eliminated insects important to the natural control of flies. In order to develop alternative methods to control *M. domestica*, this study investigated *Bacillus thuringiensis* strains able to act as promising biological control agents. Twenty two strains of *B. thuringiensis* were tested in a screening assay for selecting the most virulent ones; one third of them were virulent to *M. domestica* larva, and two of them were selected for the next tests. Bioassays were conducted with the strains S601 and S599 to determine the larval treatment efficiency; they showed efficiency to control larva of *M. domestica* in all concentrations tested. The current study also characterized the hemocytes from hemolymph of larva of *M. domestica* by their identification and quantification; also, we evaluated the effect of the strain S599 of *B. thuringiensis* infection to the total hemocytes counts, and number and size of hemocyte types, using optical microscopy. Collections were made at the times of 12, 24, 48 and 72 hrs. Five hemocyte types were found: prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, oenocytoids and spherulocytes, in which plasmatocytes were found in superior number. Prohemocytes were the smallest cells observed, and oenocytoids were the biggest ones. The treatment of *M. domestica* larva with *B. thuringiensis* did not change morphological characteristics of hemocytes, as well as it did not modify the counts of hemocyte types. The total number of hemocytes in the hemolymph, however, increased significantly 48 hours after the larval treatment. *B. thuringiensis* strains selected in the current study are promising agents for biological control of *M. domestica*.

## 1. INTRODUÇÃO

---

Desde 2011, o Brasil ocupa a sétima posição entre os maiores produtores de ovos do mundo. Em 2015 a produção foi de 39,5 bilhões de ovos, com um consumo per capita de 191,7 ovos por habitante, 91,2 milhões de aves alojadas e apenas 1,5% da produção foi direcionada ao mercado externo; sendo as granjas em sua maioria, pequenas e médias, representando 76,56% dos produtores do país (Camerini 2012; Lot et al. 2005). Nesses tipos de propriedades, a criação é feita de forma convencional, onde as aves são alojadas em gaiolas de arame galvanizado, dispostas em andares semi-sobrepostos, com distanciamento do solo para permitir o armazenamento temporário dos dejetos, que permanecem nesse local por longos períodos (Augusto e Kunz 2011). Esse substrato armazenado é excelente para o desenvolvimento de dípteros sinantrópicos, dos quais *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) representa 90% (Potenza e Tucci 2014).

*M. domestica* é um inseto com ampla distribuição geográfica, considerada praga na avicultura de postura, uma vez que atua como vetor de inúmeros patógenos de importância médica-veterinária, tais como: vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos (Potenza e Tucci 2014; Axtel e Arends 1990).

As moscas causam prejuízos diretos e indiretos. Os prejuízos indiretos são caracterizados pela transmissão de agentes patogênicos intra e inter-espécies. Dentre os prejuízos indiretos pode-se citar as coccidioses, que sozinhas foram responsáveis por um prejuízo de 1,5 bilhões de dólares em 2012 no mundo (Policarpo 2013). Já os prejuízos diretos são representados pela diminuição da qualidade dos ovos devido a deposição de sujidades; incômodo causado aos trabalhadores reduzindo a produtividade; dispersão das moscas para casas e empresas vizinhas, ocasionando demandas judiciais e impedindo a certificação da granja por parte de órgãos fiscalizadores (Potenza e Tucci 2014; Brasil 2008; Paiva 1998).

Não só importante na criação de aves, *M. domestica* é também responsável pela transmissão de importantes agentes causadores de doenças humanas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Ascaris* sp., *Toxocara* sp (Ribeiro et al 2011; Oliveira et al. 2002; Quiceno et al. 2010). A Organização Mundial da Saúde aponta que 60% das doenças de origem alimentar são causadas por alimentos contaminados (Athayde 2000) e a presença desses insetos nas indústrias de alimentos pode potencializar essa contaminação. Além da importância em aviários e na saúde

humana, a mosca doméstica é também causadora de prejuízos em criações extensivas de suínos e gado de leite, uma vez que o substrato ali produzido também é muito favorável a seu desenvolvimento.

Apesar de conviver tão intimamente com inúmeros patógenos, as moscas não sofrem injúrias graças a um sistema imune bastante eficiente composto por defesa celular e humoral. A defesa celular é realizada por células encontradas na hemolinfa chamadas hemócitos. Dentre os hemócitos existem plasmatócitos e granulócitos, os quais são responsáveis pelos processos de aglutinação, fagocitose, nodulação e encapsulamento que visam o isolamento e eliminação dos agentes patogênicos, assim como de toxinas e tecidos anormais (Silva 2002). Existem também os pró-hemócitos que são as células precursoras das demais, os oenocitoides que tem em seu citoplasma a enzima profenoloxidase, a qual participa do processo de mielinização dos agentes invasores (Lavine e Strand 2002).

Apesar de inúmeros trabalhos investigando substâncias antibacterianas produzidas por hemócitos (Meylaers et al. 2004; Wang et al. 2006; Liang et al. 2006; Ren et al. 2009), ainda são poucos aqueles que investigaram aspectos básicos da biologia dos hemócitos em larvas de *M. domestica* desafiadas com bactérias entomopatogênicas, como: tamanho celular e proporção núcleo/citoplasma, contagem total de células, distribuição dos hemócitos, etc.

O conhecimento dos mecanismos de defesa dos artrópodes pode ajudar no desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes (Silva 2002). O controle de moscas baseia-se especialmente em medidas de controle mecânico com o objetivo de secagem do esterco, destino adequado de carcaças e restos de ovos, impedindo assim a sua proliferação (Paiva 1998). Contudo, como *M. domestica* desenvolve-se rapidamente no esterco, dependendo das condições de temperatura e umidade, um atraso na implementação do manejo mecânico pode permitir o desenvolvimento de centenas de moscas. O controle químico também é utilizado, entretanto, apesar de ser eficiente, prático e de apresentar resultados rápidos; seu uso constante e indiscriminado tem selecionado indivíduos resistentes, e podem também ocasionar a intoxicação de animais e humanos e ainda contaminar o ambiente. Tais aspectos evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias de controle e por isso a utilização de agentes de biocontrole torna-se uma abordagem atrativa.

O controle biológico utiliza de organismos vivos para reduzir a população de pragas a níveis toleráveis. Dentre os microrganismos com potencial para utilização no

controle biológico podemos citar fungos, vírus, nematóides e bactérias; entre as bactérias, *Bacillus thuringiensis* ganha destaque devido elevado potencial larvicida, alta especificidade à praga alvo e por serem biodegradáveis (Monnerat 2005).

*B. thuringiensis*, chamado informalmente de *Bt*, é uma bactéria gram positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, em forma de bastonete móvel, que produz inclusões protéicas, compostas por pró-toxinas. A pró-toxina ingerida pelo hospedeiro chega ao intestino, e devido a ação de enzimas e do pH alcalino libera a toxina ativa que se liga a receptores de membrana ocasionando formação de poros e com isso a desidratação e morte da larva (Monnerat 2006).

Desde os anos de 1960, *B. thuringiensis*, especialmente *B. thuringiensis israelenses*, vem sendo estudado para o controle de moscas. Inicialmente as investigações foram feitas com a utilização de estirpes produtoras de beta-exotoxina; contudo, posteriormente foi verificado que, além de se mostrarem tóxicas para moscas, essas proteínas também apresentam efeito negativo sobre vertebrados. Dessa forma, a partir da proibição da utilização de estirpes que produzem essas toxinas ocorreu uma redução nos estudos com *B. thuringiensis* para o controle de moscas. As investigações nesse sentido retornaram no fim dos anos 90, a partir do registro de estirpes relacionadas à produção de toxinas Cry1B, altamente virulentas e que não produzem beta-exotoxina (Johnson et al. 1998; Labib and Rady 2001).

Trabalhos recentes realizados na Coreia selecionaram estirpes coreanas promissoras para o controle da mosca, já no Egito e África do Sul, trabalhos realizados com estirpes nacionais, em aviários, constataram que *B. thuringiensis* era mais efetivo quando adicionado à ração das aves, do que quando jogado diretamente no esterco (Choi et al. 1999; Labib e Rady 2001; Mwamburi et al. 2011).

No Brasil, são raros os estudos com estirpes nacionais virulentas para *M. domestica*; assim, é importante a realização de estudos sobre o tema para sustentar o desenvolvimento de produto comercial a partir de estirpes nacionais visando o controle de *M. domestica*, tornando a solução do problema mais acessível ao produtor nacional.



### 2.1. *Musca domestica*

*Musca domestica* pertence ao filo Arthropoda; classe Insecta; ordem Diptera; família Muscidae; tem o corpo segmentado em cabeça, tórax e abdome (Figura 1), três pares de patas (um em cada segmento torácico), um par de antenas, olhos compostos, os quais são formados pela união de centenas de omatídeos, e dois ou três olhos simples ou ocelos; um único par de asas membranosas (Figura 1B) um par de halteres (Taylor 2007) e estrutura da peça bucal do tipo sugador lambedor (Figura 1H). Na região dorsal do tórax existem quatro listas longitudinais escuras (Figura 1C) e o abdome é amarelado com uma faixa mediana escura que se torna difusa no segmento terminal. Na fronte da cabeça possuem faixas medianas de cor preta, na extremidade das patas, existem pêlos aderentes e também garras (Rey 2014).

**Figura 1.** Morfologia de *Musca domestica*. A) um par de antenas; B) um par de asas; C) quatro faixas negras no mesonoto; D) cabeça; E) tórax; F) abdômen; G) olhos compostos; H) aparelho bucal tipo lambedor-sugador; I) pares de patas. Fonte: Acervo pessoal.

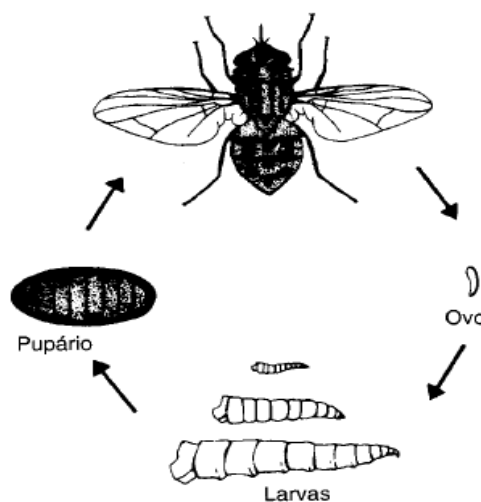


Esse díptero apresenta distribuição mundial, alto grau de sinantropismo, comportamento endofílico (intra-domiciliar) e elevada eficiência reprodutiva (Alves 2010), o que confere destacada importância entre as pragas que acometem não só os humanos, mas também animais criados em altas concentrações, já que se proliferam rapidamente tanto nas excretas dos animais como também em locais de acúmulo de lixo em decomposição. Elas se dispersam pelo estímulo olfatório ou quando em alta densidade (Axtel e Arends 1990; Axtel 1999).

Seus hábitos são diurnos, gostam de locais iluminados e quentes, tem grande capacidade de vôo (10 a 20 km), o que lhe confere grande poder de dispersão. Holometabólica, sofrem metamorfose completa com fase de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). É ovípara, depositando seus ovos em substratos diversos (Ahid 2009). Após 4 a 5 dias da eclosão dos ovos as fêmeas estão maduras para copular, quando então a fêmea coloca em seu exoesqueleto um feromônio para reconhecimento de parceiros sexuais (Montooth e Gibbs 2003). Fêmeas põem ao todo até 500 ovos de coloração branca, de 1mm de comprimento, 100 a 150 unidades por postura.

A eclosão das larvas L1 ocorre entre 12 e 24 horas, podendo se desenvolver em uma grande variedade de substratos (Aleixo et al.1984). As larvas L1, L2 e L3 nutrem-se de matéria orgânica em decomposição por 3 a 7 dias, quando então a L3 procura local mais seco para empupar, processo onde ocorre a contração do tegumento, ficando este rígido e adquirindo coloração amarelo claro até castanho-escuro com o passar dos dias. O adulto emerge após três a 26 dias dependendo das condições de temperatura (Paiva 1998) no início da fase adulta o corpo é mole e incapaz de voar, ele se move vagarosamente até encontrar local apropriado para abrir totalmente suas asas e endurecer a cutícula (Rey 2014).

**Figura 2.** Estágios de desenvolvimento de *Musca domestica*. Fonte: Ahid, S. M. M. (2009). Apostila Didática em Entomologia Veterinária.



Durante sua alimentação, a saliva é lançada sobre os materiais sólidos para dissolvê-los e permitir que sejam aspirados. Os alimentos recém-digeridos acumulam-se no divertículo esofágico para depois serem lentamente regurgitados e convergidos para

o estômago. As moscas também possuem o hábito de regurgitar uma gotícula sobre os lugares onde estão pousadas, o que contribui com a disseminação de microrganismos adquiridos em materiais fecais, secreções purulentas, lixo e outros substratos (Rey 2014).

*M. domestica*, devido seu hábito de freqüentar matéria orgânica em decomposição e material fecal, é fonte inquestionável de bactérias, fungos, vírus, helmintos e protozoários; como: *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschilli*, *Endolimax nana*, ovos de ancilostomídeo, ovos de *Hymenolepis nana*, larva de *Strongyloides stercoralis*, além de *Salmonella* spp.e *Escherichia coli*, ovos de *Ascaris* sp., *Toxascaris* sp., *Toxocara* sp., *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., oxiurídeos, triconstrogilídeos e *Acantocephala* sp. (Ribeiro et al. 2011; Oliveira et al. 2002). Esses patógenos são transportados por meios mecânicos (pernas, asas), por material regurgitado ou nas fezes (Ribeiro et al. 2011). Essa espécie é também hospedeiro intermediário de *Habronema* spp. e *Raillietina* spp. (Taylor et al. 2007). Essa ação é potencializada pela alta capacidade de locomoção dos adultos (Potenza e Tucci 2014).

## 2.2. Controle de *M. domestica*

Em aviários, o controle de *M. domestica* é feito através de medidas de controle mecânico e aplicações de produtos químicos. O controle mecânico tem como objetivo manter o esterco seco para impedir a proliferação das moscas, devendo-se verificar diariamente as instalações para identificação de pontos de vazamento de água que umidificam o esterco, impedindo sua secagem completa, além de espalhar esterco molhado sobre o seco e jogar cal ou serragem sobre os pontos de umidade, impedindo assim a proliferação de larvas, diminuindo assim o custo com outros métodos de controle (Paiva 1998; Pontenza e Tucci 2014).

A cama dos frangos, ao ser removida, deve ser mantida coberta por 30 dias, se estiver muito seca deve ser molhada para estimular a fermentação e conseqüentemente a estabilização do resíduo, caso contrário, ao ser molhada na lavoura pela chuva, pode servir de atrativo para postura de moscas; além disso, as carcaças devem ser jogadas em fossas tampadas com controle de odores (Paiva1998). Devido a alta proliferação das moscas em condições de temperatura e umidade adequadas, qualquer atraso ou falha no controle mecânico acarreta aumento significativo na população desse inseto, por isso a associação de métodos de controle é mais eficaz.

O controle químico de *M. domestica* baseia-se na utilização de substâncias químicas adulticidas ou larvicidas que, aplicados direta ou indiretamente sobre os insetos em concentração adequada, causam sua morte. As formas de aplicação podem ser em pó, pulverizações, em cordão, pincelamento, fitas gomadas e iscas (Matias 2016).

Entre as bases químicas tem-se as triazinas, que são larvicidas sistêmicos, reguladores de crescimento (Matias 2016) utilizadas na forma de pulverização direta. Os carbamatos atuam inibindo a ação da acetilcolinesterase, acumulando acetilcolina na fenda sináptica, causando hiperexcitabilidade, resultando em tremores, convulsões e colapso do sistema nervoso central seguida de morte (Matias 2016) usado em forma de pó.

Os piretróides atuam através da modulação dos canais de sódio, mantendo a entrada de sódio na célula permanente deixando-a excitada sem descanso, o que causa exaustão e morte por hiperexcitabilidade (Matias 2016). Neonicotinóides que agem competindo com a acetilcolina, mantendo ativação permanente da acetilcolina causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (Matias 2016), podem ser usados por pincelamento, pulverização ou cordões embebidos.

Ao atuarem em componentes nervosos presentes não só em insetos como também em mamíferos e outros animais, os inseticidas químicos podem causar intoxicações; seu uso constante e indiscriminado tem selecionado populações resistentes, além de contaminar alimentos e o meio ambiente (Meirelles 2005; Potenza e Tucci 2014; Londres 2011).

Isto posto, a busca por uma alternativa que possibilite a diminuição na utilização desses químicos é muito benéfica, apesar da comprovada eficiência, praticidade e resultados rápidos destes compostos (Teixeira et al. 2008). Como alternativa podem ser utilizadas medidas de controle biológico, que utilizam organismos vivos para reduzir a população de pragas a níveis toleráveis, podendo ser usados fungos, vírus, nematóides e bactérias entomopatogênicas; entre as bactérias, *Bacillus thuringiensis* ganha destaque devido ao seu elevado potencial larvicida, alta especificidade à praga alvo e por serem biodegradáveis (Monnerat 2006).

### 2.3. *Bacillus thuringiensis*

#### 2.3.1 Morfologia e Fisiologia

*B. thuringiensis* é uma bactéria gram e catalase positivas, em forma de bastonete móvel, aeróbica e anaeróbica facultativa, formadora de esporo e caracterizada por produzir inclusões protéicas cristalinas denominadas  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt) durante a fase de esporulação; outras estirpes produzem proteínas inseticidas chamadas Vip (*Vegetative Insecticidal Protein*) durante a fase vegetativa e de esporulação, as quais são encontradas no sobrenadante da cultura (Fietelson et al. 1992; Silva-Werneck et al. 2008).

A temperatura para crescimento de *B. thuringiensis* varia de 20 a 42 °C, embora temperaturas extremas causem perdas de endotoxinas. As temperaturas entre 28 e 32 °C são ótimas para a produção dessas toxinas. O pH para crescimento vegetativo desse microrganismo varia entre 5,6 e 8,5 sendo 7 o pH ótimo, já o cristal se solubiliza com pH superior a 9. Para melhor crescimento, esporulação e formação de cristal o meio de cultura deve conter no mínimo glicose, sais de magnésio, manganês (fundamental para produção do cristal), cálcio, zinco, cobre, ferro e amônia, sendo o magnésio fundamental para a esporulação (Lecuona 1996).

A técnica mais utilizada para caracterizar estirpes de *B. thuringiensis* é a Reação em Cadeia da Polimerase, a PCR (Bravo et al. 2007). Esta técnica identifica os genes que codificam as diversas proteínas que formam os cristais. Atualmente, estão catalogadas geneticamente mais de 350 proteínas cristalinas (Monnerat 2006).

#### 2.3.2 História

*B. thuringiensis* foi inicialmente isolado por Ishiwata (1902), no Japão, que estava matando o bicho-da-seda, depois, em 1913, foi isolada por Berliner, na Alemanha, região da Thuringia, onde foi encontrado infectando larvas de traça da farinha, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Em 1927, Metalnikov e Chorine nomearam esta bactéria de *Bacterium thuringiensis*. Essa bactéria foi usada pela primeira vez como biopesticida em 1938 contra larvas de lepidópteros (Jenkins et al. 1997). Em 1953, Hannay sugeriu que a patogenicidade da bactéria estaria associada a cristais formados durante a esporulação (Lecuona 1996).

*B. thuringiensis* se tornou produto comercial após a segunda guerra mundial e foi usado basicamente contra pragas de vegetais. Os produtores de *B. thuringiensis* eram tipicamente pequenas firmas familiares, que vislumbravam com a vantagem do microrganismo ser fatal apenas para poucos insetos e não afetar borboletas e outros insetos benéficos (Jenkins et al 1997).

Cinquenta anos depois da descoberta de *B. thuringiensis* ainda não se tinha evidências de sua utilização em grande escala, não se sabia como ou porque funcionava, tampouco se podia explicar porque em alguns casos funcionava e em outros não. Existiam muitas variáveis no campo e ainda não se havia testado o produto em condições de laboratório (Jenkins et al. 1997).

Nas décadas de 1940 e 1960 os pesticidas químicos eram usados indiscriminadamente e por isso *B. thuringiensis* foi deixado de lado, sendo usado apenas por agricultores que por um ou outro motivo não quiseram usar produtos químicos. Após muito tempo de uso indiscriminado de inseticidas químicos, surgiram dificuldades que tiveram que ser reconhecidas, como: ocasionar a morte de vários insetos além do alvo, poluição ambiental, desenvolvimento de populações resistentes (Jenkins et al. 1997).

Nas décadas de 1960 a 1990, *B. thuringiensis* se tornou um grande negócio. Existiam três argumentos para a indústria agroquímica despertar grande interesse por *B. thuringiensis*: 1) enquanto o desenvolvimento de um produto químico novo custava em torno de 35 a 40 milhões de dólares, o desenvolvimento de produtos a base da bactéria custava em torno de 5 milhões de dólares; 2) o tempo para lançamento de produto químico era de 8 a 12 anos, enquanto que biopesticidas demoravam em torno de 3 anos para serem lançados no mercado; e 3) o desenvolvimento de resistência a produtos químicos era mais rápido do que a biopesticidas (Jenkins et al. 1997).

### 2.3.3 Ecologia

Martin e Travers (1989) demonstraram que *B. thuringiensis* é mundialmente distribuído, encontrando-o em florestas, savanas e desertos. No solo persiste principalmente na forma de endosporo (Yara et al.1997). Tem-se encontrado *B. thuringiensis* ainda em insetos mortos (Porcar e Caballero 2000), sedimentos marinhos (Maeda et al. 2000), entre outros.

Em 1991, Smith e Couche isolaram *B. thuringiensis* em 50 a 70 % das folhas de árvores amostradas, propondo uma hipótese na qual *B. thuringiensis* seria comensal ou simbiote de plantas, oferecendo proteção contra insetos fitófagos, e por sua vez as plantas dariam nutrientes por meio de exsudatos foliares. Lee et al. (2003) isolaram *B. thuringiensis* de excrementos de diferentes espécies de vertebrados, com maior frequência em herbívoros do que em carnívoros, corroborando com a idéia da presença da bactéria nas folhas das plantas.

Em contra partida, Lambert e Pefersoen (1992) relataram que para causar a morte em insetos eram necessárias altas concentrações de esporos, como eles não germinam em ambientes naturais não poderiam ser responsabilizadas pelo controle de populações de insetos em ambientes naturais. Os mesmos autores relataram que apenas em depósitos de grãos armazenados foram detectadas epizootias por *B. thuringiensis*, devido possivelmente as condições do meio, especialmente pela ausência de radiação solar e alta densidade de insetos.

#### 2.3.4 Produção de toxinas

*B. thuringiensis* produz inclusões cristalinas compostas por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry-cristal e Cyt-citolítica) durante a fase de esporulação (Silva-Werneck et al. 2008). A toxina de *B. thuringiensis* é mais potente do que inseticidas piretróides e organofosforados, já que é usada em concentrações de 10 a 50 g por acre ou  $10^{20}$  moléculas por acre, enquanto que os piretróides são usados em concentrações de  $3 \times 10^{22}$  moléculas por acre, ou 80.000 vezes maior do que os organofosforados, que são aplicados em concentração de  $8 \times 10^{24}$  moléculas por acre (Fietelson 1992).

As proteínas Cry são consideradas como os principais constituintes dos cristais que caracterizam *B. thuringiensis*. A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das sequência de aminoácidos, existindo mais de 300 diferentes genes *Cry*, e as proteínas agrupadas em 49 classes, somando 436 proteínas Cry diferentes (Crickmore et al. 1998).

A estrutura de cada delta-toxina varia conforme o gene que a codifica. Vários genes já foram identificados e classificados conforme o tamanho e papel biológico de seus produtos (Hofte e Whitely 1989). São toxinas altamente específicas para o inseto

alvo, inócuas aos humanos, vertebrados e plantas, e são completamente biodegradáveis (Bravo 2007).

As delta-endotoxinas são paraesporais e são vistas ao microscópio. Sua forma varia conforme sorotipo e condições do meio (Lecuona 1996). São pró-toxinas que são ingeridas (Alves 1997) e o cristal ou pró-toxina Cry inicialmente se dissolve no intestino médio do inseto onde o pH é alcalino, sofre ação de enzimas proteolíticas liberando a toxina ativa, que se liga a receptores da membrana celular do intestino, gerando poros que causam distúrbios no balanço osmótico da célula, levando primeiramente ao inchaço da célula e depois sua lise. As larvas intoxicadas param rapidamente de se alimentar e eventualmente morrem (Fietelson 1992).

**Tabela 1.** Descrição das toxinas Cry produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* e seus genes codificadores (Monnerat 2006).

Gene	Proteínas codificadas	Tamanho (kDa)	Atividade
<i>Cry1</i>	36 subgrupos representados por <i>Cry1Aa</i> ,..., <i>Cry1Ka</i>		Lepidópteros e dípteros e coleópteros
<i>Cry2</i>	<i>Cry2Aa</i> , <i>Cry2Ab</i> , <i>Cry2Ac</i> e <i>Cry2Ad</i>	65	Larvicida para lepidópteros e baixa atividade contra dípteros
<i>Cry3</i>	<i>Cry3Aa</i> , <i>Cry3Ba</i> , <i>Cry3Bb</i> e <i>Cry3Ca</i>	73 a 75	Coleópteros
<i>Cry4</i>	<i>Cry4Aa</i> e <i>Cry4Ba</i>	128 e 135	Dípteros
<i>Cry5</i>	<i>Cry5Aa</i> e <i>Cry5Ab</i>	152 e 142	Nematoides, ácaros, formigas, coleópteros e lepidópteros,
<i>Cry6</i>	<i>Cry6Aa</i> e <i>Cry6Ba</i>		Nematoides e ácaros
<i>Cry7</i>	<i>Cry7Aa</i> e <i>Cry7Ab</i>	129 130	Coleópteros e lepidópteros
<i>Cry8</i>	<i>Cry8Aa</i> , <i>Cry8Ba</i> e <i>Cry8Ca</i> .	131 134 130	Coleópteros e afídeos Coleópteros Coleópteros
<i>Cry9</i>	<i>Cry9Aa</i> , <i>Cry9Ba</i> , <i>Cry9Ca</i> , <i>Cry9Da</i> , <i>Cry9Ea</i> e <i>Cry9Eb</i>	132	Lepidópteros Coleópteros
<i>Cry10</i>	<i>Cry10 Aa</i>	78	
<i>Cry11</i>	<i>Cry11Ba</i> <i>Cry11Bb</i>	81 84	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex pipiens</i> <i>Anopheles stephensi</i> (Diptera: Culicidae) <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles albimanus</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae)
<i>Cry12</i>	<i>Cry12Aa</i>	142	Nematoides e ácaros
<i>Cry13</i>		88	Nematóides



<i>Cry14</i>	Cry14Aa	132	Dípteros e coleópteros
<i>Cry15</i>		34	Lepidópteros,
<i>Cry19</i>	Cry19Aa e Cry19Ba	75 a 78	Dípteros
<i>Cry20</i>	Cry20Aa	86	Dípteros: <i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Cry21</i>	Cry21Aa e Cry21Ba		Nematoides
<i>Cry22</i>	Cry22Aa Cry22Ab e Cry22Ba	79	Himenópteros Coleoptera
<i>Cry23</i>			Alvos ainda não foram determinados
<i>Cry24</i>			Alvos ainda não foram determinados
<i>Cry25</i>	Cry25Aa	76	Dípteros
<i>Cry26</i>			Não tiveram ainda sua atividade determinada
<i>Cry27</i>		94	
<i>Cry28</i>			Não tiveram ainda sua atividade determinada
<i>Cry29</i>	Cry29Aa		OrdemDiptera
<i>Cry30</i>	Cry30Aa		OrdemDiptera
<i>Cry31</i>			Não tiveram seus alvos determinados até o momento
<i>Cry32</i>			Não tiveram seus alvos determinados até o momento
<i>Cry33</i>			Não tiveram seus alvos determinados até o momento
<i>Cry34</i>	Cry34Aa,Cry34Ab, Cry34Ac e Cry34Ba	14	Coleópteros
<i>Cry35</i>	Cry35Aa, Cry35Ab e Cry35Ac	44	Coleóptero
<i>Cry36</i>			Coleóptero
<i>Cry37</i>			Ainda não teve seu alvo determinado
<i>Cry38</i>			Coleópteros
<i>Cry39</i>			Mosquicida
<i>Cry40</i>			Mosquicida
<i>Cry41</i>	Cry41Aa, Cry41Ab e Cry42Aa, Cry43Aa e Cry43Ba		Aindanãotiveram sua atividade determinada

As proteínas Cyt compõem uma inclusão paraesporal de *B. thuringiensis* com atividade hemolítica. Atualmente são conhecidas 27 proteínas Cyt (Crickmore et al., 1998). Constituídas pelos grupos Cyt1 que possui três integrantes: Cyt1Aa, Cyt1Ab e Cyt1Ba, com peso molecular de 27 kDa; e Cyt2 com cinco integrantes: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca, e peso molecular de 29 kDa. Todas são ativas contra ordem Díptera (Monnerat 2006).

Assim como as proteínas Cry, as Cyt são formadas como pró-toxinas que são clivadas no intestino do inseto onde o pH é em torno de 9, liberando a toxina ativa que interagem diretamente com lipídeos da membrana e adentrando a membrana causam

formação de poros ou desestruturam a bicamada lipídica das membranas causando lise celular que levam o inseto a morte (Jisha et al. 2013; Bravo et al. 2007).

Algumas estirpes produzem proteínas inseticidas chamadas Vip (*Vegetative Insecticidal Protein*) durante as fases vegetativa e de esporulação, as quais são secretadas no sobrenadante da cultura (Silva-Wernecket al. 2008). As proteínas Vip não formam inclusões cristalinas e por isso foram excluídas do grupo de proteínas Cry. Essas toxinas têm ação inseticida contra coleópteros (Vip1 e Vip2) e contra lepidópteros (Vip3) atuando também de forma sinérgica às proteínas Cry (Shi et al. 2004; Lee et al. 2003).

Produzida por algumas variedades durante seu crescimento vegetativo, e também chamada de thuringiensina, a Beta-exotoxina é solúvel em água e estável ao calor, definida como nucleotídeo composto por adenina, ribosina, glicose, ácido alárico, e um grupo fosfato (Sebesta et al. 1968). A beta-toxina é tóxica para ampla gama de insetos: Lepidoptera, Diptera, Coleóptera, Hymenoptera, Isoptera e Orthoptera; sendo as larvas normalmente mais suscetíveis do que os adultos; sabe-se que esta toxina é ativa também em humanos e quase todas outras formas de vida; por isso, sua presença é proibida em produtos comerciais (Jisha et al. 2013; Sebesta et al. 1968). Sua toxicidade está relacionada a capacidade de inibição da síntese dRNA, pela inibição da RNA polimerase, sendo análoga a nucleotídeos (Sebesta et al. 1968); doses subletais provocam anomalias, e alterações teratológicas.

Células vegetativas e esporos de *B. thuringiensis* produzem várias enzimas tais como lecitinases, quitinases, e proteases que possibilitam sua proliferação no hospedeiro (Lecuona 1996). Sua natureza e seu modo de ação não são conhecidos. A toxicidade é muito inespecífica atingindo desde insetos até vertebrados, desde que em elevadas doses (Luthy e Ebersold 1981<sup>apud</sup> Leucona 1996). Toumanoff chamou a alfa-exotoxina de Lecitinase-C; esta é solúvel em água, termolábil e tóxica para insetos, exige pH entre 6,6 e 7,4 para melhor atuação (Alves 1997).

### 2.3.5 Resistência

Hall(1961) estabeleceu que não existe nenhuma evidencia do desenvolvimento de resistência por parte dos insetos a *Bacillus thuringiensis*. Feigin (1963) tentou selecionar mosca domestica para resistência a *B. thuringiensis* em um estudo onde a pressão de seleção foi de 40% por 27 gerações, e não obteve sucesso; acreditou que a

pressão de seleção foi muito baixa; concluindo com isso que a resistência se desenvolve de maneira muito lenta, não alcançando os níveis encontrados quando se compara a produtos químicos.

Em meados de 1980 foram obtidas por experimentos de seleção em laboratório, várias populações de diferentes espécies de insetos com diferentes níveis de resistência a *B. thuringiensis* (Ferre et al. 1995).

Estratégias de manutenção de baixa resistência tentam prevenir ou diminuir a seleção de indivíduos que carreguem genes de resistência e tentam manter a frequência desses genes suficientemente baixa para controle dos insetos (Alstad e Andow 1995). Essas estratégias incluem: utilização de toxinas variadas, rotação de culturas, altas dosagens e manutenção de áreas de refúgio (áreas sem toxina)(Ferre et al. 1995).

#### 2.4 Sistema imunológico de *M. domestica*

Os insetos estão presentes em todos os nichos ecológicos e sofrem constantes intervenções de variados patógenos. Para sua sobrevivência foi necessário o desenvolvimento de um eficiente sistema de defesa, composto por defesas físicas, celulares e humorais (Silva 2002).

As primeiras barreiras são representadas pelo tegumento, espiráculos do sistema respiratório, traquéia e trato digestório incluindo membrana peritrófica e epitélio (Dunn, 1986). Ferimentos no exoesqueleto dos insetos representam importante porta de entrada para inúmeros patógenos; para contornar essa situação os insetos desenvolveram método bastante eficiente de coagulação da hemolinfa através da combinação da ação de proteínas da hemolinfa com células de defesa (Silva 2002).

A defesa celular conta com as células da hemolinfa chamadas de hemócitos. Essas células são encontradas em sua maioria na porção posterior do corpo, em massas celulares onde ocorre a hematopoiese; poucos hemócitos são encontrados livres na hemolinfa durante os estádios larvares (Nappi et al. 1971). Acredita-se que os hemócitos são atraídos para os locais de injúria por quimiotaxia, estimulados diretamente pelo parasito ou por substâncias liberadas pelos poucos hemócitos circulantes, quando estes encontram o invasor (Nappi et al. 1971). Os hemócitos encontrados em *Musca domestica* são: plasmatócitos, granulócitos e pró-hemócitos (Silva 2002), entretanto

outros tipos celulares já foram encontrados por diferentes autores (Mishra 2015; Fernandes 2010).

Os plasmatócitos são células com tamanhos e formas bastante variados, são as mais numerosas células da hemolinfa, participam dos processos de fagocitose, encapsulamento, nodulação e apoptose (Alves 1997); possuem receptores de membranas capazes de reconhecer bactérias invasoras (Kocks et al 2005; Manaka et al. 2004); a má função desses receptores afeta sua capacidade de reconhecer corpos estranhos (Honti et al. 2014). Além dos plasmatócitos, dentre as outras células descritas, os granulócitos são as principais células responsáveis pelos mecanismos de defesa na maioria dos insetos (Ratcliffe et al. 1985). Os esferulócitos são conhecidos como células responsáveis pelo transporte de componentes da cutícula (Sass et al. 1994). Os oenocitoides contém no seu citoplasma a enzima pró-fenoloxidase que participa do processo de mielinização (Ashida e Dohke 1980; Jianget al 1997). Os pró-hemócitos são também conhecidos como *stem cells* ou células precursoras de granulócitos, plasmatócitos e células intermediárias (Borowska 2006); são as menores células encontradas, com núcleo ocupando quase a totalidade do citoplasma, sua forma é redonda, sem projeções citoplasmáticas. O número e os tipos celulares variam com o estágio no qual a larva se encontra (King e Hillyer 2013).

Alguns microrganismos desenvolveram mecanismos de escape desse sistema celular, como o fungo *Metarhizium anisopliae* que libera uma protease inibidora da ação de fagocitose pelos plasmatócitos dos insetos infectados, e como o endoparasitoide *Venturia casnesca* (Hymenoptera: Ichneumonidae) que injeta junto com seus ovos uma substância inibidora de protease e partículas de vírus, que possibilitam o sucesso do parasitismo (Beckage 1998).

A defesa humoral é feita por proteínas solúveis da hemolinfa, sendo muitas delas inibidoras de fungos e bactérias. Algumas delas causam perda da parede celular, outras rompem a bicamada lipídica da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *B. thuringiensis*, por exemplo, possui um sistema de escape caracterizado pela produção de zinco-protease que degrada as cecropinas (proteínas do sistema de defesa humoral). Outros peptídeos desse sistema são: atacinas, lisozimas que hidrolisam as cadeias glicídicas da camada de peptidoglicana da parede celular, causando ruptura da parede celular e morte da bactéria (Silva 2002).

### 3. JUSTIFICATIVA

---

*Musca domestica* devido seu alto grau de sinantropismo, alta eficiência reprodutiva e alta capacidade de dispersão é uma das pragas de grande importância não só para saúde humana como também para saúde animal. Esse díptero atua como vetor mecânico de inúmeros patógenos como vírus, rickettsias, bactérias, e também protozoários e ovos de helmintos transportando-os tanto por meios mecânicos (patas e asas), como por material regurgitado, ou nas fezes, além de servir também como hospedeiro intermediário de *Habronema* spp. e *Railletina* spp.

Nos aviários de postura, devido ao acúmulo de esterco embaixo das gaiolas, as moscas encontram local bastante favorável a sua proliferação, usando as excretas das aves como alimento para os estádios larvares e por esse material possuir umidade adequada para o desenvolvimento.

Para o controle dessa praga são usados constantemente inseticidas químicos, os quais têm proporcionado seleção de indivíduos resistentes; estes deixam resíduos em alimentos e no ambiente, o que vem causando intoxicações constantes aos humanos. Como alternativa, alguns estudos têm desenvolvido métodos para controle biológico desse artrópode, o qual se utiliza de agentes entomopatogênicos para a redução da população de pragas.

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria presente em todo mundo, gram positiva, em forma de bastonete móvel, aeróbica e anaeróbica facultativa, formadora de esporo e caracterizada por produzir inclusão protéica cristalina denominadas  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt) durante a fase de esporulação. Sua utilização como bioinseticida está bastante consolidada datando desde antes da segunda grande guerra. A utilização dessa bactéria apresenta vantagens que a tornaram muito estudada e aplicada. São elas: o desenvolvimento de produtos a base de *B. thuringiensis* custa muito menos do que o desenvolvimento de um produto químico novo; o tempo para desenvolvimento do produto é em torno de um terço do tempo para desenvolvimento de um produto químico; além disso, o desenvolvimento de resistência a produtos químicos já é comprovado para várias bases, e se faz de maneira muito mais rápida do que para um bioinseticida. No entanto, poucos estudos selecionaram estirpes de *B. thuringiensis* com eficácia para controle de *M. domestica*.

O presente estudo busca selecionar estirpes de *B. thuringiensis* com toxicidade expressiva contra larvas de *M. domestica*, para que estas possam futuramente ser

formuladas para controle desse artrópode, especialmente em granjas de frangos. Além disso, buscou o entendimento das alterações causadas pelo patógeno na hemolinfa das larvas, uma vez que esse conhecimento ajuda no desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes.

*M. domestica*, assim como muitos outros insetos, estão presentes em nichos ecológicos com constantes intervenções de variados inimigos. Para sua sobrevivência foi necessário o desenvolvimento de um eficiente sistema de defesa, composto por imunidade adquirida, imunidade natural. (Silva 2002).

Os hemócitos são as células envolvidas nos mecanismos de defesa dos insetos, mas também desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento dos insetos; no entanto, poucos trabalhos reportam a caracterização deles na hemolinfa de *M. domestica*. Estas células têm importante participação nos mecanismos de coagulação, estoque, metabolismo e hormonal, assim como acomodação interna dos órgãos no processo de muda (Wigglesworth 1972, 1979; Percy 1978). São os hemócitos que iniciam o combate a parasitas e patógenos invasores da hemocele ( Ratcliffe et al. 1985).

Neste sentido, o presente estudo buscou quantificar e caracterizar os hemócitos de larvas de *M. domestica* desafiadas com *B. thuringiensis*. Os resultados obtidos neste estudo servirão de subsídios para a identificação do papel de cada tipo celular para melhor entendimento da resposta desse artrópode a invasão desse patógeno, especialmente àqueles sugeridos como agentes microbianos para seu controle e para elucidação das diferenças imunológicas causadas por *B. thuringiensis* na hemolinfa das larvas de *M. domestica*

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo geral

Selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para *Musca domestica*, e investigar os efeitos dessa sobre o perfil de hemócitos de larvas, de 4 a 5 dias, tratadas.

### 4.2 Objetivos específicos

Selecionar entre 22 estirpes de *B. thuringiensis*, aquelas com expressiva toxicidade contra larvas de *M. domestica*;

Determinar a eficácia do tratamento larval das estirpes de *B. thuringiensis* mais tóxicas para *M. domestica*;

Avaliar os tipos de hemócitos encontrados em larvas de *M. domestica* após tratamento com *Bacillus thuringiensis* S599;

Avaliar alterações morfológicas em hemócitos de larvas de 4 a 5 dias de *M. domestica* tratadas com *B. thuringiensis*;

Determinar as alterações na contagem total e diferencial de hemócitos em larvas tratadas com *B. thuringiensis*.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

---

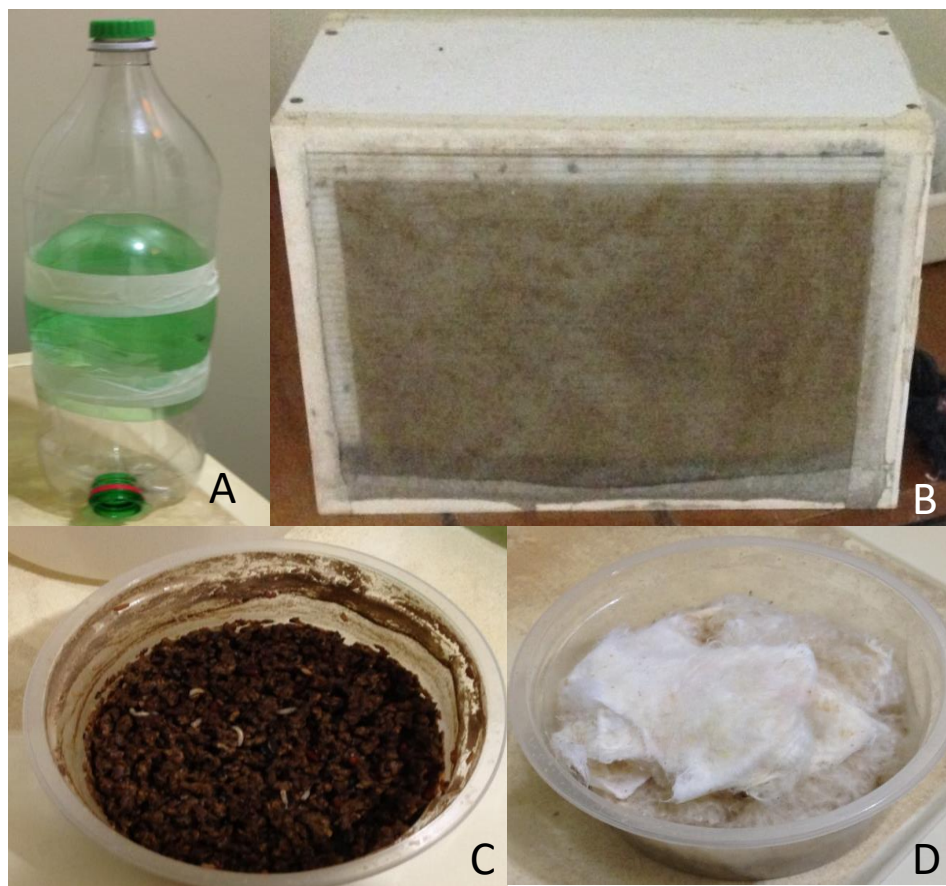
### 5.1 Criação de *Musca domestica*

Os primeiros exemplares adultos de *Musca domestica* foram capturados aos arredores do aviário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, GO. Foram utilizadas armadilhas feitas com garrafas pet de 2 L (Fig. 3A), como isca usou-se mel industrializado (Karo®, Unilever, Garanhuns, PE, Brasil). As moscas foram identificadas segundo MARICONI (1999), no Laboratório de Patologia de Invertebrados, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP). Após identificação, os indivíduos foram acondicionados em gaiolas entomológicas no tamanho de 41 cm × 20 cm × 27 cm (Fig. 3A).

A dieta para larvas era constituída de ração para galinhas poedeiras (Guabi®, Anápolis, Goiás, Brasil) umedecida com água (Fig. 3C), e para os adultos a dieta era constituída de leite em pó umedecido com água colocado sobre algodão (Fig. 3D) para evitar afogamento das moscas. Esse substrato também foi utilizado para oviposição e trocado diariamente. Os ovos, juntamente com o algodão, eram transferidos para potes plásticos de 200 mL contendo ração de poedeira, onde ocorria a eclosão e a recria das larvas. As gaiolas foram mantidas no biotério do IPTSP em temperatura ambiente, 25 ± 5 °C.



**Figura 3.** Utensílios utilizados na criação de *Musca domestica*. A) armadilha feita com garrafa pet de 2L; B) Gaiola entomológica onde era mantida a criação; C) Pote plástico contendo ração para galinha poedeira onde se recriavam as larvas; D) substrato de alimentação das moscas adultas e de oviposição, composto por leite em pó, água e algodão.



## 5.2 Estirpes de *Bacillus thuringiensis* estudadas.

As estirpes testadas estão listadas na Tabela 2, sendo provenientes do banco de *Bacillus* spp. entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen.

**Tabela 2.** Siglas das estirpes testadas, variedade e origem.

Estirpe	Variedade	Local de isolamento
S62	<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i>	Sombrio – Santa Catarina
S127	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	França
S202	<i>Bacillus thuringiensis tochiensis</i>	Mato Grosso
S456	<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i>	Cruz das Almas - Bahia
S597	<i>Bacillus thuringiensis galleriae</i>	Brasília – Distrito Federal
S599	<i>Bacillus thuringiensis kenya</i>	Londrina - Paraná
S601	<i>Bacillus thuringiensis thuringiensis</i>	Londrina – Paraná

<b>S608</b>	<i>Bacillus thuringiensis fukuokaensis</i>	Londrina – Paraná
<b>S612</b>	<i>Bacillus thuringiensis darmstadiens</i>	Londrina – Paraná
<b>S615</b>	<i>Bacillus thuringiensis sotto</i>	Londrina – Paraná
<b>S619</b>	<i>Bacillus thuringiensis sooncheon</i>	Londrina – Parana
<b>S655</b>	<i>Bacillus thuringiensis alesti</i>	Taubaté – São Paulo
<b>S711</b>	<i>Bacillus thuringiensis japonensis</i>	Recife – Pernambuco
<b>S728</b>	<i>Bacillus thuringiensis thuringiensis</i>	Pará
<b>S845</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bahia
<b>S907</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Londrina – Paraná
<b>S1122</b>	<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>	Argentina
<b>S1178</b>	<i>Bacillus thuringiensis xianguongies</i>	Argentina
<b>S1207</b>	<i>Bacillus thuringiensis selouensis</i>	Argentina
<b>S1267</b>	<i>Bacillus thuringiensis finitimus</i>	São Paulo
<b>S1271</b>	<i>Bacillus thuringiensis canadensis</i>	São Paulo
<b>S1450</b>	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	Herault – Montpellier – França

### 5.3 Bioensaios

#### 5.3.1 Seleção de estirpes tóxicas

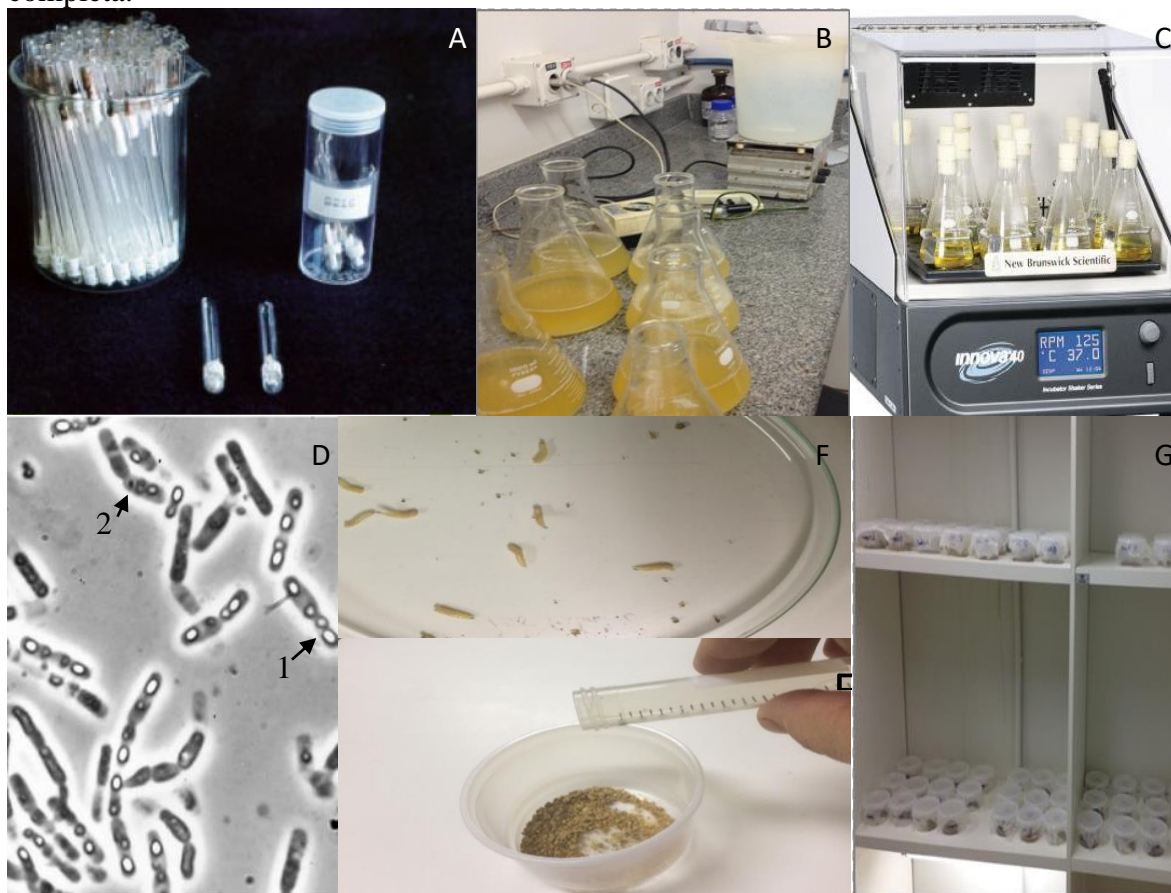
Foram testadas 22 estirpes de *B. thuringiensis*; as amostras recebidas da coleção apresentavam-se conservadas em papel filtro (Fig. 4A) e foram inoculadas em 40 ml de meio NYSM esterilizado (Fig. 4B), contendo caldo nutriente, fosfato de potássio, extrato de levedura e solução de sais (Yousten 1984). Foram cultivadas em incubador rotativo a 200 rpm e temperatura de  $28 \pm 4$  °C, por um período de 72 h (Fig.4C).

Foram realizados testes de viabilidade em todas as amostras cultivadas (Fig. 4D). Para cada amostra foram preparadas três réplicas em potes plásticos de 200 ml contendo 3 g de ração para galinhas poedeiras e quatro ml de meio líquido com bactéria (Fig. 4 E) e 10 larvas de *M. domestica* de 4 a 5 dias pós eclosão (Fig. 4F), somando 30 larvas por estirpe testada (Fig.4B). A mortalidade foi avaliada após 48 horas e as duas estirpes que causaram maior mortalidade foram selecionadas para os próximos ensaios.

Para o teste de viabilidade uma gota da suspensão mãe era colocada sobre lâmina e lamínula e depois observada em microscopia de contraste de fase. A presença de esporos e cristais era observada para atestar a viabilidade da suspensão.

Como controle utilizou-se 3g de ração para galinha poedeira umidecido com 4ml de meio NYSM puro.

**Figura 4.** Seleção de estirpes tóxicas. A) *Bacillus thuringiensis* conservado em papel filtro (Monnerat 2006). B) Foto do preparo do meio NYSM líquido para cultura de *B. thuringiensis*. C) Meios NYSM líquido com *Bacillus thuringiensis* em shaker a 200rpm por 72 hrs, para crescimento da cultura. D) Foto do teste de viabilidade realizado antes dos bioensaios, onde se observa a presença de esporos(1) e cristais(2) . E) Potes plásticos contendo 3g de ração para poedeira onde foi vertido 4 ml de meio líquido com *B. thuringiensis* F) Larvas de *M. domestica* contadas e posteriormente colocadas nos potes plásticos. G) Disposição dos potes plásticos contendo as larvas expostas ao tratamento, em uma repetição completa.



### 5.3.2 Bioensaio para cálculo de Eficácia do Tratamento Larval (ETL)

Foram testadas as estirpes S601 e S599, que se encontravam liofilizadas (Fig. 5A). Foram testadas nas seguintes concentrações: 0,125mg/g ; 0,250mg/g ; 0,5mg/g; 1mg/g; 5mg/g; 10mg/g; 15mg/g e 20mg/g de ração para galinha poedeira.

As estirpes foram pesadas, depois diluídas em 4ml de Tween 80 a 0,01% (Fig. 5C) e em seguida homogeneizadas em vórtex (Fig. 5D). Foram então adicionadas em 3g de ração e colocadas em potes plásticos de 200ml (Fig. 5E). Em cada pote foram colocadas 10 larvas de *M. domestica* com idade entre quatro a cinco dias de vida (Fig

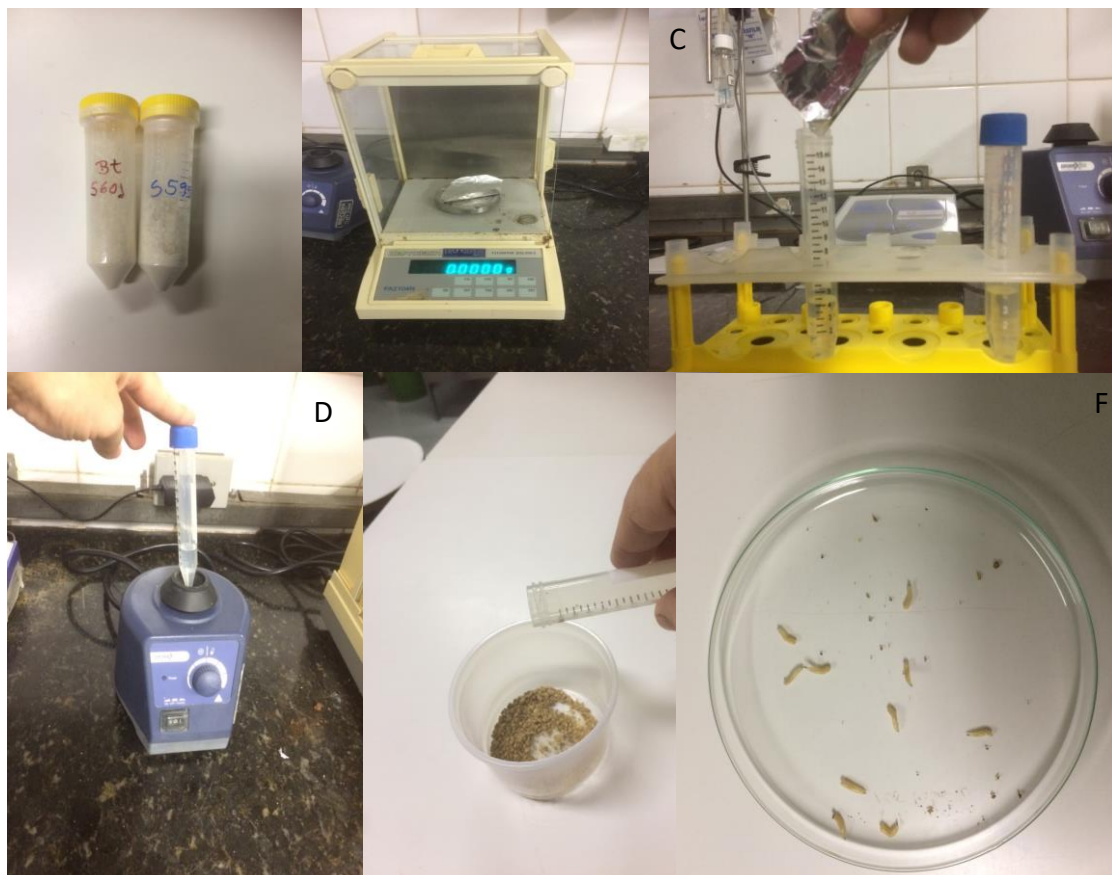
5F). O bioensaio foi conduzido a  $27 \pm 1$  °C e UR>80%, e avaliado diariamente por 10 dias, a mortalidade das larvas e das pupas foi avaliada após 10 dias do início do bioensaio. Fez-se três réplicas por concentração por bioensaio, e o bioensaio foi conduzido por três vezes em dias diferentes.

A fórmula utilizada para cálculo da eficácia do tratamento larval foi:

$$ETL = ML + (1-ML)^* /MPR$$

ML = mortalidade larval  
MPR = mortalidade de pupas  
ETL= Eficiência do tratamento larval

**Figura 5.** Teste de Eficiência do Tratamento larval de *Musca domestica* . A) *Bacillus thuringiensis* liofilizado; B) Foto da pesagem de *B. thuringiensis* liofilizado; C) Tubos Falcon de 15 ml contendo 4 ml Tween 80 a 0,01% acrescentando *B. thuringiensis*; D) Agitação do meio contendo Tween 80 a 0,01% e *B. thuringiensis* em vórtex; E) Potes plásticos contendo 3g de ração para poedeira onde foi vertido 4 ml de meio líquido com *B. thuringiensis*; F) Larvas de *M. domestica* contadas e posteriormente colocadas nos potes plásticos.



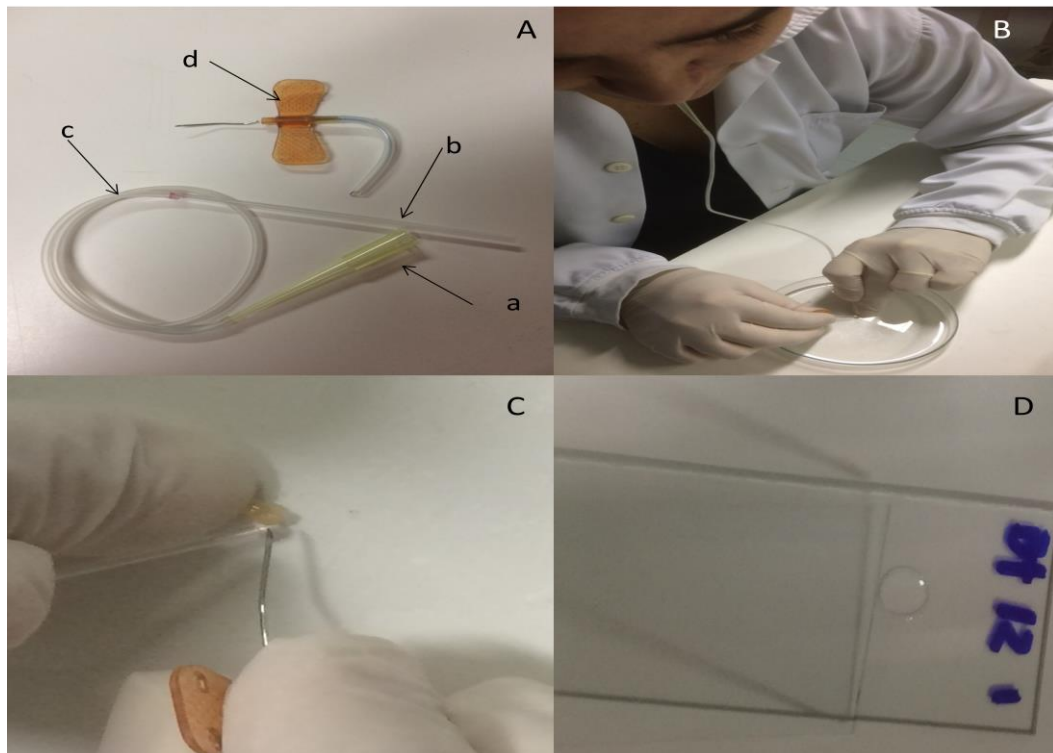
5.4 Caracterização morfológica dos hemócitos presentes na hemolinfa de larvas de *M. domestica*.



#### 5.4.1 Coleta de hemolinfa

Larvas de terceiro instar, L3, foram retiradas da colônia e imediatamente borrifadas com álcool a 70%, enxaguadas em água destilada, e depois colocadas sobre papel toalha estéril para remoção do excesso de água. Com auxílio de uma ponteira de 200  $\mu$ l (Fig. 6Aa) acoplada à mangueira de um escalpe 25G (LAMELID<sup>®</sup>) (Fig. 6Ac), conectada a um tudo capilar de micro-hematócrito (PERFECTA<sup>®</sup>, Ibitinga, SP)(Fig.6Ab) foi feita a coleta de hemolinfa segurando-se a larva com o dedo médio e furando-a com a agulha do escalpe na extremidade posterior (Fig. 6 B,C); a hemolinfa foi então coletada cuidadosamente para que ficasse no tubo de hematócrito. Uma gota da amostra era depositada imediatamente em lâmina de vidro (Fig.6 D), previamente esterilizada com álcool 70%, onde confeccionou-se um esfregaço utilizando-se uma outra lâmina de vidro.

**Figura 6.** Coleta hemolinfa de *Musca domestica*: A)Material usado para coleta de hemolinfa; a)Ponteira de 200 $\mu$ l; b) tudo capilar de micro-hematócrito; c)mangueira de escalpe 25G; d) agulha de escalpe 25G; B) Coleta da hemolinfa; C) ponto de coleta da hemolinfa; D) Gota de hemolinfa depositada sobre lâmina previamente esterilizada.



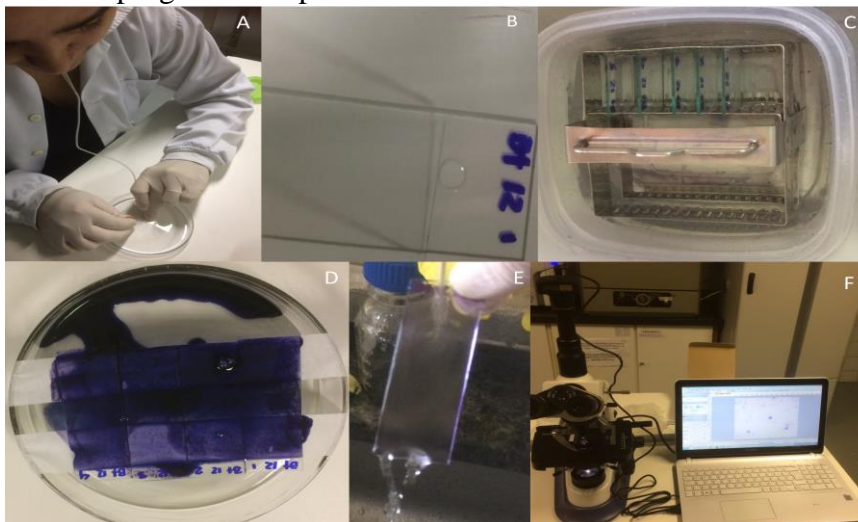
#### 5.4.2 Preparação das lâminas

Após a realização do esfregaço (Fig. 7B), as lâminas ficaram secando em temperatura ambiente por 30 minutos, após os quais, foram colocadas em um recipiente contendo metanol (Fig. 7C), onde ficaram por 7 minutos para fixação do material. Em seguida, o material foi corado com Giemsa (New Prov<sup>®</sup>, Pinhais, PR) por 12 minutos (Fig. 7D) e depois foi lavado em água corrente para retirada do excesso de corante. A hemolinfa de cada larva resultou em uma lâmina, foram feitas cinco lâminas para cada uma das três repetições.

As células foram classificadas morfolologicamente com auxílio de microscópio óptico no aumento  $400\times$  e  $1000\times$ , levando-se em consideração: tamanho de célula, proporção núcleo/citoplasma, presença de grânulos, homogeneidade de citoplasma, presença de filopódios.

As fotos foram realizadas com auxílio de microscópio óptico com câmera acoplada (Leica DN 750) e as medições das células realizadas pelo software LAZ EZ no aumento  $1000\times$ . Para o cálculo do diâmetro celular foram medidos 25 granulócitos, 25 plasmatócitos, 25 pró-hemocitos, 15 oenocitoides e 15 esferulócitos em cada uma das três repetições, calculando-se então a média e o desvio padrão das amostras. Para o cálculo da proporção núcleo/citoplasma foram medidas as circunferências do núcleo e do citoplasma de 10 células de cada tipo celular e de cada repetição, somando-se 30 células de tipo.

**Figura 7.** Método de coloração Giemsa: A) Coleta de hemolinfa; B) preparo do esfregaço; C) Fixação em Metanol (7min); D) Coloração Giemsa por 12 minutos; E) Lavagem das lâminas em água corrente; F) Microscópio óptico com câmera acoplada e computador com o programa Toupview.



5.5 Efeitos de *B. thuringiensis* no perfil de hemócitos de hemolinfa de larvas de *M. domestica*.

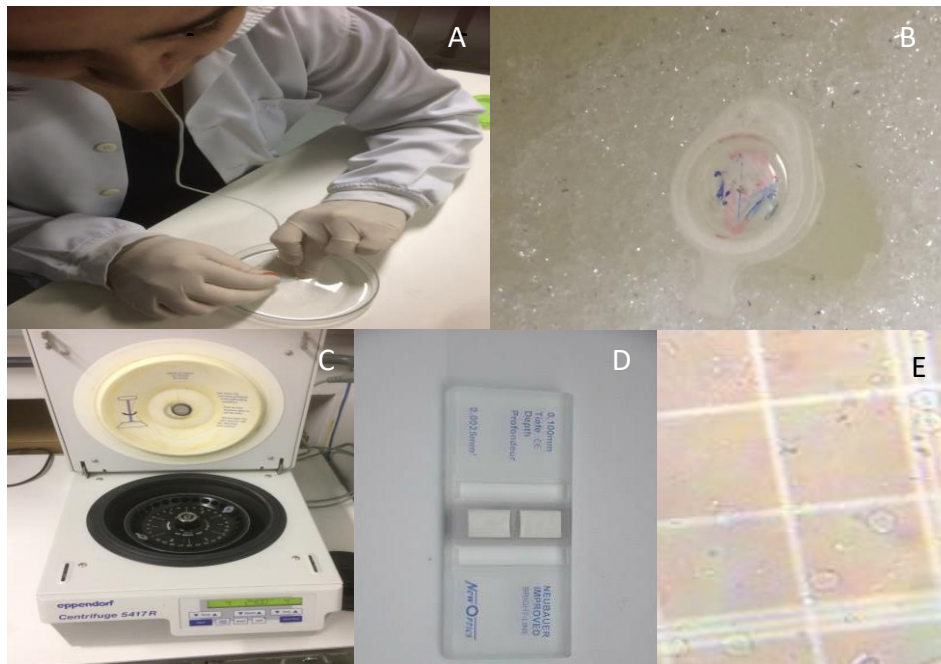
5.5.1 Suspensão de *Bacillus thuringiensis* e tratamento das larvas de *M. domestica*.

Os ensaios foram conduzidos com *Bacillus thuringiensis* S599 previamente liofilizada. A concentração utilizada foi de 1mg/g de ração de galinha poedeira. Foram pesados 3 g de ração para galinha poedeira colocados em potes plásticos de 200ml. Em tubos de centrifugação de 15 ml foram colocados 4ml de Tween 80 0,01% e depois adicionadas a bactéria *B. thuringiensis* S599 e homogeneizada em vórtex. A solução foi vertida em pote plástico contendo a ração e 150 larvas de *M. domestica*; cada pote com larvas foi referente a um tempo de coleta de hemolinfa após tratamento: 12 h, 24 h, 48 h, e 72 h. Três repetições independentes foram conduzidas.

5.5.2 Contagem de células totais da hemolinfa de *M. domestica*

A hemolinfa foi coletada como indicada no item 5.4.1 e colocada em microtubo de 1,5 ml com 30µl de inibidor de protease (Inhibit<sup>®</sup> Sigma Aldrich) e 82µl de PBS(NaCl 1,5 M; EDTA 50 mM; pH 7,4), e mantida sob refrigeração. Após a coleta a amostra foi centrifugada a 5040g durante 4 minutos em centrífuga para microtubos refrigerada a 4 °C. A quantificação dos hemócitos foi feita após sua ressuspensão em 200 µL de tampão fosfato pH 7,4 com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico no aumento de 400 ×.(tampão fosfato 0,1M; NaCl 1,5 M; pH 7,4)

**Figura 8.** Contagem Total de células de *Musca domestica*: A) Coleta de hemolinfa; B) Microtubos com 30µl de inibidor de protease e 82µl de PBS, em gelo para coleta de hemolinfa; C) Centrifuga de Microtubos de 1,5ml refrigerada; D) Câmara de Neubauer; E) Visualização da Câmara de Neubauer em objetiva de 40×.



### 5.5.3 Contagem diferencial de células

Para a identificação das células foi utilizado microscópio óptico no aumento 400×, e em cada lâmina foram contadas e classificadas 200 células randomicamente. Foram examinadas cinco lâminas para cada tempo de coleta em cada repetição. Foram feitas três repetições, somando-se então 15 lâminas examinadas para cada tempo e 3000 células para cada tempo. Foram feitas médias de cada repetição e calculado o desvio padrão.

### 5.5.4 Avaliação do tamanho celular

Para observação do efeito do tratamento com *B. thuringiensis* no tamanho dos hemócitos foram medidos 25 granulócitos, 25 plasmatócitos, 25 pró-hemócitos, 15 oenocitoides e 15 esferulócitos de cada repetição, somando-se 75 para os três primeiros tipos celulares e 45 para os últimos dois, e calculando-se então a média e o desvio padrão. Para o cálculo da proporção núcleo/citoplasma foram medidas 10 células de cada tipo e de cada repetição, somando-se 30 células analisadas.



#### 5.5.5 Proporção núcleo/citoplasma

Para o cálculo da proporção núcleo/citoplasma foram medidas as circunferência do núcleo e do citoplasma de 10 células de cada tipo celular em cada uma das três repetição, somando-se 30 células de cada tipo.

#### 5.6 Análise estatística

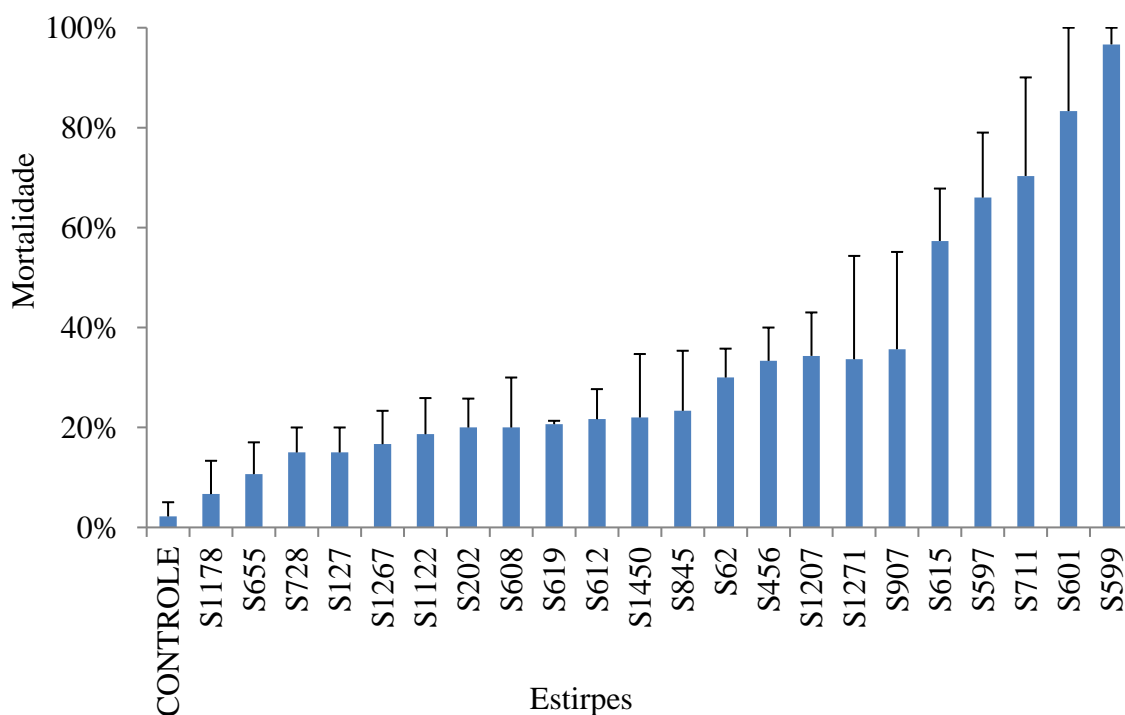
A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA com intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ), seguida por análise de comparação de médias pelo teste Student Newman-Keuls (SNK).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Seleção de estirpes tóxicas

Dentre as 22 estirpes estudadas, S601 causou mortalidade de 83% e S599 de 97%, 48 horas após tratamento, conforme apresentado na Fig. 1. Dezesete das estirpes causaram mortalidade inferior a 40%, não se mostrando, portanto, eficazes para controle de *M. domestica*; S615, S587 e S711 apresentaram mortalidade de 57, 66 e 70% respectivamente, entretanto não foram selecionadas para o teste de Eficácia do Tratamento Larval (ETL) devido a existência de estirpes mais eficazes.

**Figura 9.** Mortalidade média de larvas L3 de *Musca domestica* tratadas com cada uma das 22 estirpes de *Bacillus thuringiensis*.



### 6.2 Bioensaio para cálculo de Eficácia do Tratamento Larval

A estirpe S601 não causou significativo percentual de mortalidade das larvas e mortalidade das pupas quando comparado ao grupo controle, não variando também

entre as diferentes concentrações testadas. Quanto ao teste para avaliação da ETL, expressivos valores de eficiência foram observados em todas as concentrações. A estirpe S599 também apresentou resultados estatisticamente representativos com relação à mortalidade larval e de pupas, e apresentou eficácia do tratamento larval em todas as concentrações testadas, alcançando percentuais superiores a 74% em todas as concentrações, conforme dados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Mortalidade larval, mortalidade de pupas e eficácia do tratamento larval de *M. domestica* tratadas com diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis* estirpes S601 e S599, 10 dias após tratamento. Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5%.

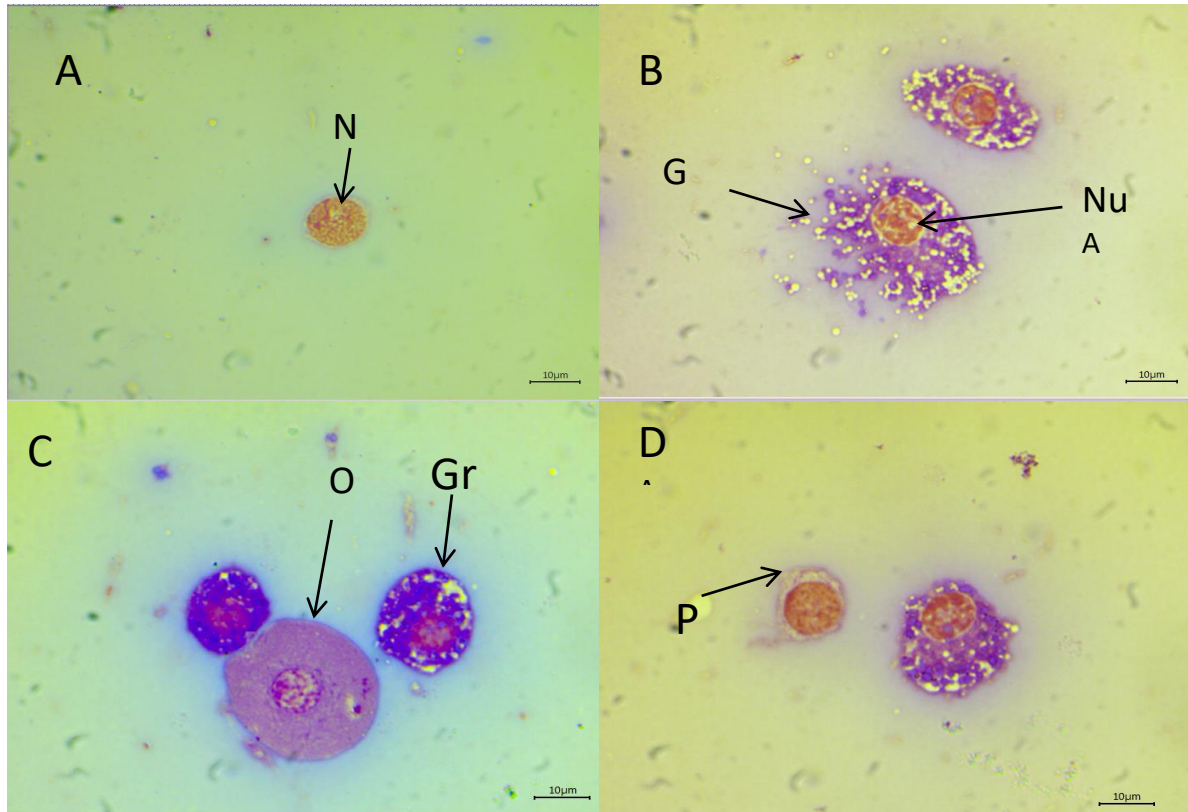
Isolado	Doses mg/g	Mortalidade larval	Mortalidade pupas	Eficácia tratamento larval (ETL%)
Controle		8,89±2,94a	19,07±8,69aA	
S601	0,125	13,34±10,88a	66,81±19,32b	68,08±24,93a
	0,25	3,06±2,49a	46,44±19,92b	47,33±25,28a
	0,5	5,56±2,49a	61,31±20,37b	63,09±19,05a
	1	7,87±4,07a	77,41±13,49b	78,37±13,57a
	5	25,01±12,53a	97,78±2,222b	97,78±2,22a
	10	32,96±16,48a	96,11±2,422b	97,5±1,27a
	15	42,13±12,57a	85,19±12,14b	90,42±7,55a
	20	41,98±14,89a	69,75±16,64b	86,22±8,44a
S599	0,125	12,63±6,25AB	69,17±25,18B	80,99±15,52A
	0,25	16,48±9,43AB	71,85±19,96B	73,64±21,41A
	0,5	19,69±2,36AB	88,40±5,87B	90,95±4,59A
	1	26,17±14,79AB	86,3±1,16B	89,74±2,81A
	5	35,68±12,65AB	67,44±19,85B	79,36±10,68A
	10	45,25±10,47AB	75,00±25B	81,25±18,75A
	15	53,33±24,03BC	87,78±10,6B	97,48±1,31A
	20	67,78±23,57C	55,56±29,4B	97,94±2,05A

### 6.3 Caracterização morfológica de hemócitos.

Foram encontrados, tanto no grupo controle como no grupo tratado com *B. thuringiensis* S599, cinco tipos de hemócitos, sendo eles: plasmatócitos, granulócitos, pró-hemócitos, esferulócitos e oenocitoide.

- Pró-hemócitos (Figura 6A): representaram 9% das células; eram pequenos com forma redonda, núcleo ocupando quase a totalidade do citoplasma ( $72,04 \pm 6,74\%$ ), sem projeções evidentes e medindo em média  $11,8 \pm 1,75 \mu\text{m}$ ;
- Plasmatócitos (Figura 6B): foram as células mais freqüentes (51%); se apresentaram de forma bastante variável, com núcleo central, simples ou duplo, ocupando  $40,26 \pm 14,2\%$  do citoplasma. O citoplasma apresentou-se com inúmeras projeções de formas e tamanhos variados, em geral homogêneo, sem granulações e com diâmetro médio de  $21,8 \pm 9,01 \mu\text{m}$ ;
- Granulócitos (Figura 6B,C): foram o segundo tipo celular mais abundante, representando 38% das células; eram células arredondadas ou ovaladas com núcleo relativamente pequeno, ocupando  $33,36 \pm 7,87\%$  do citoplasma. No citoplasma foram encontradas grandes quantidades de grânulos, a membrana citoplasmática era bem evidente, e diâmetro médio de  $14,2 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ;
- Oenocitoides (Figura 6C): representaram 1% das células encontradas, eram as maiores células, com diâmetro de  $30,4 \pm 5,7 \mu\text{m}$  em média, possuem forma arredondada, com núcleo pequeno, na maioria das vezes centralizado, e ocupando  $13,5 \pm 4,2\%$  do citoplasma.
- Esferulócitos (Figura 6D): representaram 1% do total de células, com núcleo pequeno e excêntrico, e citoplasma com muitos grânulos. A membrana citoplasmática não era evidente, conferindo à superfície celular aspecto de amora, com diâmetro médio de  $18,7 \pm 10,6 \mu\text{m}$ ; muitas vezes com aspecto de célula em decomposição.

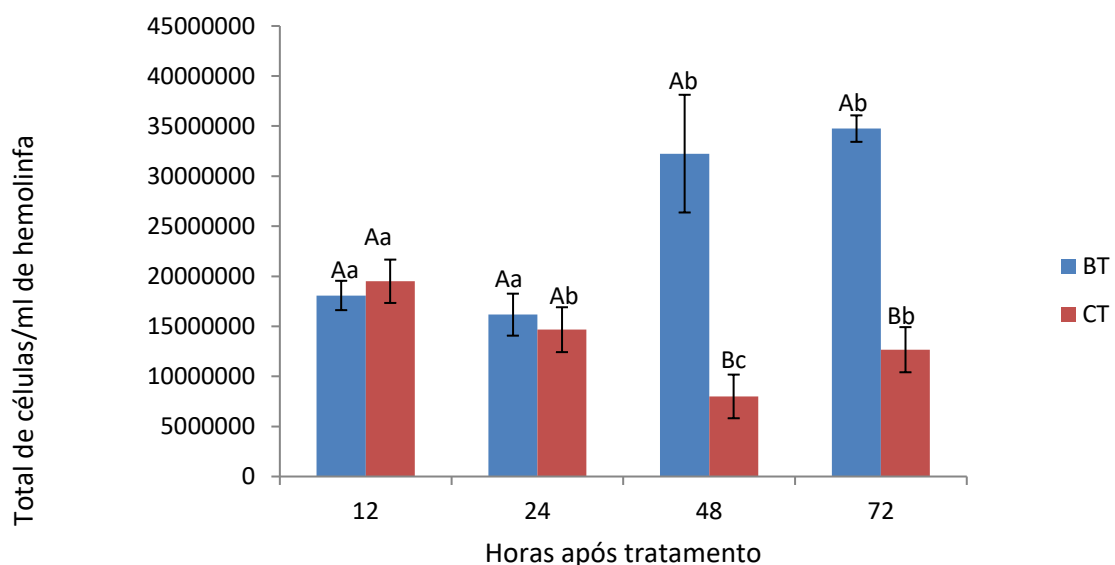
**Figura 10.** Hemócitos da hemolinfa de larvas de *Musca domestica* corados com Giemsa, e observados por microscopia óptica no aumento de 100×. Em A) pró-hemócito onde o núcleo(Nu) ocupa grande parte da célula; B) esferulócitos apresentando grande quantidade de grânulos(G)com núcleo(Nu) central e relativamente pequeno; C) oenocitóides(O) que são as maiores células encontradas, e granulócitos(Gr); D) plasmatócitos(P) que apresentam inúmeras projeções citoplasmáticas conferindo a essa célula grande variação no formato.



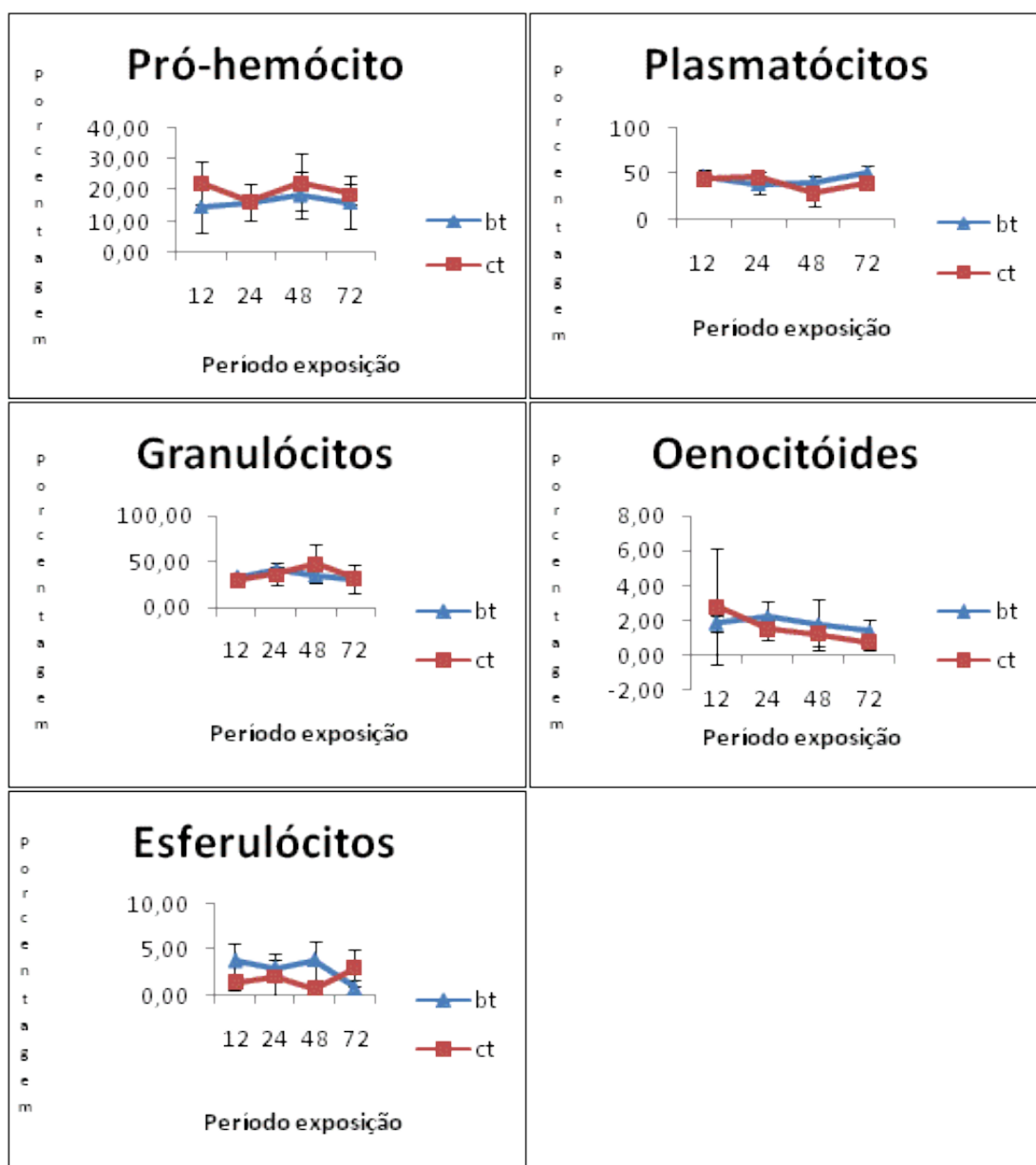
#### 6.4 Efeitos de *B. thuringiensis* no perfil de hemócitos de hemolinfa de larvas de *M. domestica*.

A exposição de larvas de *M. domestica* a estirpe S599 de *B. thuringiensis* na concentração de 1mg/g de ração de poedeiras causou uma elevação bastante significativa na contagem total de hemócitos 48 horas após tratamento, alcançando aproximadamente  $35 \times 10^6$  células/ml de hemolinfa, enquanto no mesmo período o grupo controle apresentou contagem inferior a  $10 \times 10^6$  de células/ml de hemolinfa (Figura 11). Entretanto, na contagem diferencial de hemócitos o tratamento não resultou em distribuição diferente em relação ao grupo controle, sendo a porcentagem de pró-hemócitos entre 15 e 25 % do total de células, plasmatócitos entre 30 e 45%, granulócitos 25 e 50%, oenocitoides 1 e 3% e os esferulócitos que representaram de 1 a 4% dos hemócitos totais (Figura 12). Com relação às outras mensurações realizadas, o tratamento não resultou em alterações, ficando o tamanho (Figura 13) e a proporção núcleo/citoplasma (Tabela 4) dos hemócitos iguais estatisticamente em relação ao observado no grupo controle.

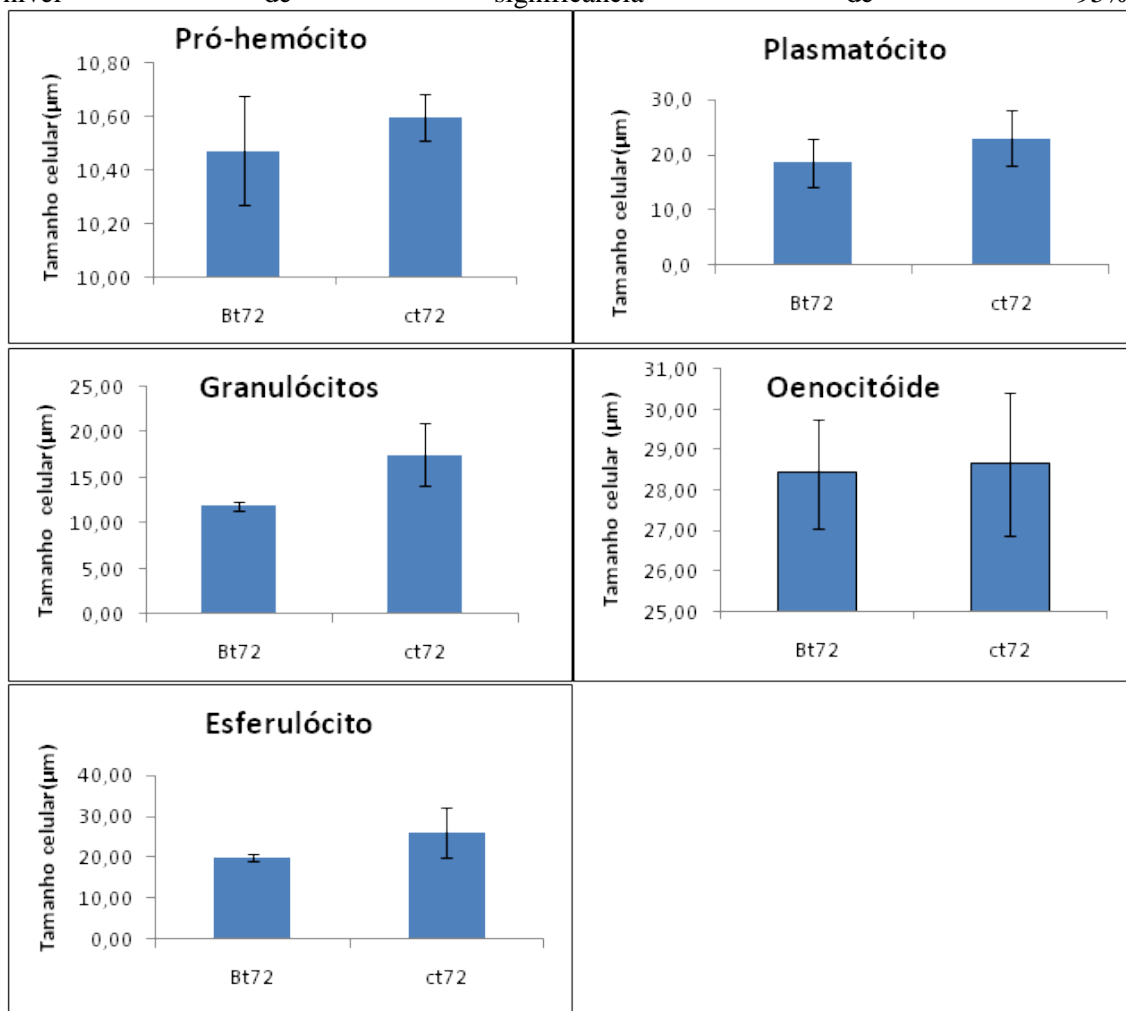
**Figura 11.** Contagem total de células da hemolinfa de larvas de *M. domestica* tratadas com a estirpe S599 de *Bacillus thuringiensis* na concentração de 1mg de esporos liofilizados/mg de ração de poedeira. Médias seguidas de mesma letra maiúscula em um mesmo período, ou de mesma letra minúscula nos diferentes intervalos de tempo dentro do mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 5%. Onde BT representa grupo tratado com *Bacillus thuringiensis* e CT representa grupo controle.



**Figura 12.** Contagem diferencial dos hemócitos de larvas de *Musca domestica*. Distribuição temporal dos diferentes hemócitos na hemolinfa de larvas de *M. domestica* tratadas com *Bacillus thuringiensis* S599, e grupo controle, analisados estatisticamente por ANOVA e pelo teste de Student-Newman-Keuls com nível de significância de 95%. Não houve diferença significativa em nenhum dos resultados. Onde *Bt* representa o grupo tratado com *Bacillus thuringiensis* e *ct* o grupo controle.



**Figura 13.** Comparação do tamanho celular de hemócitos da hemolinfa de larvas de *Musca domestica* tratadas com *Bacillus thuringiensis* S599, 72 horas após tratamento, e grupo controle. Analisados estatisticamente por ANOVA e pelo teste de Student- Newman- Keuls com nível de significância de 95%.



**Tabela 4.** Proporção núcleo/citoplasma de hemócitos de larvas de *Musca domestica*, 72 horas após tratamento com *Bacillus thuringiensis* S599 na concentração de 1mg de esporos liofilizados por grama de ração de poedeira.

Tipos celulares	Controle (%)	<i>B. thuringiensis</i> S599 (%)
Pró-hemócito	72,04±6,74a	73,88±1,51a
Plasmatócito	40,26±14,2a	44,9±3,59a
Granulócito	33,36±7,87a	30,32±1,67a
Oenocitóide	13,5±4,2a	10,83±0,33a
Esferulócito	20,61±5,19a	23,18±4,02a



No presente estudo *B. thuringiensis* mostrou-se promissor para o controle de *M. domestica*, assim como já havia se mostrado promissor como agente de biocontrole para diversas pragas: *Aedes aegypti* (Beltrão et al., 2007), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Berlitz 2004; Tremilios et al., 2008) e diversos outros insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (Praça et al., 2004). Apesar de existirem estudos que avaliaram a toxicidade de *B. thuringiensis* contra larvas de *M. domestica*, a maioria foi conduzido fora do Brasil: África do Sul (Mwamburi et al., 2011), Inglaterra (Johnson et al., 1998), França (Burgerjon e Galichet, 1965), Estados Unidos (Lancey e Mulla, 1976), Arábia Saudita (Abozinadah et al., 2011); raros são os estudos nacionais que selecionaram estirpes autóctones de *B. thuringiensis* promissoras para o controle de *M. domestica* (Zimmer et al., 2013; Duarte et al., 2009).

Neste trabalho selecionou-se as estirpes S601 e S599, que demonstraram relevante eficácia do tratamento larval (ETL), como promissoras candidatas a agentes de biocontrole de *M. domestica*. Zimmer et al.(2013) também testaram a toxicidade de *Brevibacillus laterosporos*, *Bacillus thuringiensis israelensis* e *B. thuringiensis kurstaki* contra larvas de *M. domestica* e obtiveram mortalidade larval de até 53% , resultados esses próximos aos obtidos no presente estudo. No entanto, cabe ressaltar que comparações entre metodologias e estirpes diferentes são de pouca expressão, uma vez que existem centenas de toxinas produzidas por diferentes estirpes de *Bacillus* sp. (Monerat 2005).

Outros estudos também mostraram diferentes formas de utilização do microrganismo para finalidades de controle de *M. domestica*, como a utilização direta de delta-endotoxinas, capazes de causar elevados percentuais de mortalidade de larvas (Mehrabi et al., 2015); a utilização da toxina pura propicia utilização de concentrações muito menores do que esporos de *B. thuringiensis*. Além disso, a administração de *B. thuringiensis israelensis* junto à ração para tratamento de aves também mostrou-se capaz de reduzir 90% das larvas de *M. domestica* após quatro semanas do tratamento (Mwamburi et al., 2011).

No bioensaio conduzido com objetivo de selecionar estirpes com notável toxicidade contra larvas de *M. domestica* foram utilizados esporos produzidos em meio líquido NYSM (Yousten 1984). Nesse ensaio as estirpes mostraram virulência notadamente superior do que nos testes onde foi avaliada a eficácia do tratamento larval

com diferentes concentrações de esporos. Nesse segundo ensaio, foram utilizados esporos liofilizados, sugerindo que o processo de liofilização pode diminuir a concentração de toxinas e ocasionar a perda de outras toxinas que podem atuar sinergicamente para o sucesso do tratamento, conforme reportado por Angelo et al. (2010). Além disso, outros fatores também podem interferir na eficácia do tratamento, como diferentes formas de aplicação dos esporos, que podem alterar a concentração das toxinas, e a viabilidade dos insetos alvo (Mwamburi et al., 2011).

O presente estudo também caracterizou cinco tipos de hemócitos da hemolinfa de *M. domestica*, os quais foram reportados por Abozenadah (2010) na mesma espécie. Outros tipos celulares, não observados nesse estudo também já foram reportados na literatura, como trombocitoides (Fernandes, 2010), e células intermediárias (Mishra, 2015). Além disso, o tratamento por *B. thuringiensis* não causou alterações morfológicas dos hemócitos de larvas tratadas, assim como não resultou em diferenças nas concentrações dos diferentes tipos de hemócitos. Esse relato contraria as observações de Abozenadah (2010) que observou diminuição do tamanho dos pró-hemócitos e alterações citoplasmáticas em plasmatócitos, além de degeneração da membrana citoplasmática de granulócitos e extrusão do núcleo de algumas células, em larvas de *M. domestica* tratadas com *B. thuringiensis israelensis*. É importante ressaltar que essa variação de resposta nos dois estudos pode estar relacionada com a diferença de toxinas produzidas pelas estirpes investigadas. Entretanto, o aumento significativo do número de células na hemolinfa das larvas 48 horas após tratamento foi expressivo em ambos os estudos, fato este explicado pelo mecanismo de ação de delta-toxinas de *B. thuringiensis*, que causam formação de poros na membrana intestinal causando perda de fluidos, desidratação e conseqüentemente elevando a concentração dos hemócitos na hemolinfa (Jisha et al., 2013).

Neste sentido, o presente estudo destaca a seleção de estirpes nacionais de *B. thuringiensis* como possíveis candidatas ao controle de *M. domestica*. Destaca também que danos à fisiologia de larvas podem ser observados 48 horas após exposição das mesmas à ração tratada com esporos de *B. thuringiensis* estirpe S599. Além de demonstrar que a estirpe S599 possui notável eficácia do tratamento larval para *M. domestica*, o que a elege como promissor agente de controle biológico para este díptero.

## 8. CONCLUSÃO

---

- *Bacillus thuringiensis* S599 e S601 mostraram-se promissoras para o controle de *Musca domestica*.
- Os tipos celulares encontrados na hemolinfa de larvas de *Musca domestica* foram: plasmatócito, granulócitos, esperulócitos, pró-hemócitos e oenocitoides.
- O tratamento com *Bacillus thuringiensis* S599 eleva a contagem total de hemócitos, no entanto não causa alterações na morfologia e a contagem diferencial de hemócitos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABOZINADAH, N. Y.; ABULDAHB, F. F.; NAWAL and Al-HAIQI, S. Study of using the bacterium *Bacillus thuringiensis israelensis* in microbial control of *Musca domestica* vicina (Muscidae, Diptera). *Journal of Entomology and Nematology*. v.3, p.58-67, 2011.
- AHID, S. M. M. Apostila Didática de Entomologia Veterinária, Mossoró, RN, p.5-16, 2009.
- ALEIXO, R. C.; LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. Criação da mosca doméstica para suplementação alimentar de rãs. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, v.11, 1984(Informe Técnico,46).
- ALSTAD, D. N.; ANDOW, D. A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, v.268, cap.5219, p.1894-1896, 1995.
- ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; CAPALBO, D. M. F. Seleção de matéria prima para a elaboração de meio de cultura para produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. *An. Sociedade Entomológica do Brasil*. v.26, p.379-382, 1997.
- ALVES, C. Manejo de *Musca domestica* em indústria de alimentos; Universidade Vale do Rio dos Sinos. [Dissertação de Mestrado em Biologia], 2010.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. *Ciências Agrárias*, v. 31, p. 945-958, 2010.
- ASHIDA, M.; DOHKE, K. Activation of prophenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm *Bombyxmori*. *Insect Biochemistry*.v.10, p.37–47,1980.
- ATHAYDE, A. Controle integrado de pragas assegura a inocuidade dos alimentos. *Revista da Associação Brasileira de Engenheiros de Alimentos*.v.29, p.20-25, 2000.
- AUGUSTO,K. V. Z.; KUNZ, A. Tratamento de dejetos de aves poedeiras comerciais. In: PALHARES, J. C. P.; KUNZ, A. (Ed.). Manejo ambiental na avicultura, Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p.153-174, 2011.
- AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. *Annual Review of Entomology*. v.35, p.101-126, 1990.
- AXTELL, R. C. Poultry integrated pest management: Status and future. *Integrated Pest management Reviews*.v.4, p.53-73, 1999.
- BECKAGE, N. E. Modulation of immune responses to parasitoids by poly dna viruses. *Parasitology*. v. 116, p. 557-564, 1998.

BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *FEMS Microbiology Letters*. v.266, p.163-169, 2007.

BERLITZ, D. L.; FIUZA, L. M. Avaliação toxicológica de *Bacillus thuringiensis* *kaizawai* para *Sp odoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Biociências*. v.12, p.115-119, 2004.

BOROWSKA, J. Effects of heavy metal on an organism: Studies on cellular, individual and population levels in *Musca domestica* L. [Doctoral Thesis]. Jagiellonian University, Kraków, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º64 de 18 de dez. 2008. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p.4, 2008.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*.v.49, p.423-435, 2007.

BURGERJON, A.; GALICHET, P. F. The Effectiveness of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on larvae of *Musca domestica* Linnaeus. *Journal Pathology of Invertebrates*. vol. 2, p.263-264, 1965.

CAMERINI, N. L. Efeitos de sistemas de criação e do ambiente sobre desempenho e qualidade dos ovos de galinhas poedeiras, Campina Grande. [tese de doutorado, Engenharia Agrícola], 2012.

CHOI, M. Y., LEE, H. S., LEE, K. M., HOMMA, K., NATORI, S., LEE, B. L., Molecular cloning and functional properties of two early stage encapsulation-relating proteins from the coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry*. v. 262, p.737–744, 1999.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*. v.62, p.807-813, 1998.

DUARTE, P. J. P.; CÁRCAMO, M. C.; ZIMMER, C. R.; RIBEIRO, P. B.; LEITE, F. P. L.; Patogenia de *Bacillus thuringiensis* e *Bravibacillus laterosporus* em larva de *Musca domestica* (Diptera, Muscidae) em laboratório; XI encontro de pós-graduação, XVIII Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas.p.5, 2009.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. *Annual Review of Entomology*. v.31, p.321-339, 1986.

FERRE, J.; ESCRICHE, B.; BEL, Y.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of the insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, *FEMS Microbiology Letters*. v.132, p.1-7, 1995.

FERNANDES, E. G. Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e *Musca domestica* (Diptera:Muscidae): Imunologia, interação

patógenos-hospedeiro, Fisiologia e Controle biológico, Porto Alegre, RS, [ Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiente ] 2010.

FIETELSON, J. S., J. PAYNE & L. KIM. *Bacillus thuringiensis*: Insect and beyond. *Nature Biotechnology*. v.10, p.271-275, 1992.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insectidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Review*. v.53, p.242-255, 1989.

HONTI, V.; CSORDÁS, G.; KURUCZ, E.; MÁRKUS, R.; ANDÓ, I. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Developmental and Comparative Immunology*. v.42, p.47–56, 2014.

JENKINS, R.; ROMAN, M.; EINARSSON, P. Bt a short history of *Bacillus thuringiensis*. *Department of Entomology*, University of Arizona, 1997.

JIANG, H.; WANG, Y.; MA, C.; KANOST, M. R. Subunit composition of pro-henoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO–P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v.27, p.835–850, 1997.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; BENJAMIN, S. An Overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*. v.3, p.462-472, 2013.

JOHNSON, C.; BISHOP, A. H.; TURNER, C. L. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the house fly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Invertebrate Pathology*. v.71, p.138-144, 1998.

KING, J. G.; HILLYER, J. F. Spatial and temporal *in vivo* analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biology*. p.11-55, 2013.

KOCKS, C.; CHO, J. H.; NEHME, N.; ULVILA, J.; PEARSON, A. M.; MEISTER, M.; STROM, C.; CONTO, S. L.; HETRU, C.; STUART, L. M.; STEHLE, T.; HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; FERRANDON, D.; RÄMET, M.; EZEKOWITZ, R. A. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. v.123, p.335–346. 2005.

LABIB, I. M.; RADY, M. Application of *Bacillus thuringiensis* in poultry houses as a biological control agent against the house fly, *Musca domestica* orbens. *Journal Egypt Society of Parasitology*. v. 31, p. 531-44, 2001.

LACEY, L. A.; MULLA, M. S. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* as a biocide of blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. v.30, p.46-49, 1977.

LAMBERT, B.; PEFFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience*. v.42, p.112-122, 1992.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v.32, p.1295–1309, 2002.

LECUONA, R. E. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. *Talleres Gráficos Mariano Mas*, cap. 4, p.61-72, 1996.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. v.69, p.4648-4657, 2003.

LIANG, Y.; WANG, J. X.; ZHAO, X. F.; DU, X. J.; XUE, J. F. Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Developmental and Comparative Immunology* v.30, p.249–257, 2006.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: Um Guia para ação em defesa da vida. Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa; Rio de Janeiro, v.2, p.25-34, 2011.

LOT, L. R. T.; BROEK, L.; MONTEBELLO, P. C. B.; CARVALHO, T. B. Mercado de ovos: Panorama do setor e perspectivas. *Anais XLII Congresso da Sober*. Ribeirão Preto, p.1-15, 2005.

MAEDA, M.; MIZUKI, E.; NAKAMURA, Y.; HATANO, T.; OHBA, M. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Current Microbiology*.v.40, p.418-422, 2000.

MANAKA, J.; KURAISHI, T.; SHIRATSUCHI, A.; NAKAI, Y.; HIGASHIDA, H.; HENSON, P.; NAKANISHI, Y. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. v.279, p.48466-48476, 2004.

MARICONI, F. A. M.; GUIMARÃES, J. H.; FILHO, E. B. A mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas. Piracicaba: Editora FEALQ, p. 29- 43, 1999.

MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. v.55, p. 2437-2442, 1989.

MATIAS, R. S. Insetos 2016. Disponível em <https://www.pragas e eventos.com.br/saude-ambiental/como-agem-os-inseticidas-nos-insetos>. Acesso em 01/12/2016.

MEIRELES, L. C. O papel da ANVISA na Regulação e Controle dos Agrotóxicos, Seminário Nacional de Vigilância do Câncer Ambiental e Ocupacional, RJ, 2005.

MEYLAERS, M.; CLYNEN, E.; DALOZE, D.; DELOOF, A.; SCHOOFS, A. Identification of 1-lysophosphatidylethanolamine (C16:1) as an antimicrobial compound in the housefly, *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v.34, p.43–49, 2004.

MEHRABI, M. R.; ZOGHIMOFRAD, L.; MAZINANI, M.; AKBARZADEH, A.; RAHIMI, A. A study of the effect of *Bacillus thuringiensis* serotype H14 (subspecies *israelensis*) delta endotoxin on *Musca* larva. *Turkish Journal of Medicine Sci.* v.45, p.794-799, 2015.

MISHRA, S.; KUMAR, P.; MALIK, A. The effect of *Beauveria bassiana* infection on cell mediated and humoral immune response in house fly, *Musca domestica* L. *Environmental Science and Pollution Research* v.22, p.15171–15178, 2015.

MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: Oliveira-Filho; Monnerat. (Org.). Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. 1.ed. Brasília: Embrapa Cerrados, v.1, p. 121-156, 2006.

MONTOOTH, K.; GIBBS, A. Cuticular pheromones and water balance in the house fly, *Musca domestica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v.135, p.457-465, 2003.

MWAMBURI, L. A.; LAING, M. D.; MILLER, R. Laboratory and field evaluation of formulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a feed additive and using topical applications for control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae incaged-poultry manure. *Environmental. Entomology*. v.40, p.52-58, 2011.

NAPPI, A. J.; SWTFOLANO, J. G. Distribution of haemocytes in larvae of *Musca domestica* and *Musca autumnalis* and possible chemotaxis during parasitization hemocytic reactions and capsule formation in the host, *Musca domestica*. *Experimental Parasitology*. v.29, p.116-125, 1971.

OLIVEIRA, V. C.; MELLO, R. P.; ALMEIDA, J. M. Dípteros muscoides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. *Saúde Pública*. v.36, p.614-620, 2002.

PAIVA, D. Instrução Técnica para o Avicultor. Controle integrado de moscas em avicultura intensiva de postura; EMBRAPA, 1998.

POLICARPO, T.; PANDOLFI, C.; SOARES, A.; URIO, E. A.; MAHL, D. L.; GOTTLIEB, J.; ROSES, T.; OLIVEIRA, D. Levantamento parasitário em aves de produção controlada e não controlada, Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguiaia. p. 12p, 2013.

PERCY, J. Haemocytes associated with basement membrane of sex pheromone gland of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Ultrastructural observations. *Canada. Journal of Zoology*. v.56, p.238-245, 1978.

PORCAR, M.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during natural epizootic. *Journal of Applied Microbiology* v.89, p.309-316, 2000.

POTENZA, M. R.; TUCCI, E. C. Controle de pragas na avicultura. *Simpósio Brasil Sul de Avicultura*, Chapecó, SC. p.24-27, 2014.



PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.39, p.11-16, 2004.

QUICENO, J.; BASTIDAS, X.; ROJAS, D.; BAYONA, M. *Musca domestica* portadoras de patógenos. *Revista U.D.C. A Actualidad E Divulgación Científica*. v.13, p.23-29, 2010.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RIIODES, C. P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology* v.97, p.183-349, 1985.

REN, Q.; ZHAO, X. F.; WANG, J. X. Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*). *Journal Genetics Genomics*. v.36, p.7-16, 2009.

REY, L. Bases da parasitologia Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2014.

RIBEIRO, M. J. R.; DIAS, S. M. F.; TESHIMA, E.; BARBONI, A. R. Insalubridade ambiental e aspectos sociais associados a patógenos intestinais isolados de dípteros. *Eng. Saint Ambient*, vol. 16, p. 83-90, 2011.

SASS, M.; KISS, A.; LOCKE, M. Integument and hemocyte peptides. *Journal Insect Physiology*. v.40, p.407-421, 1994.

SEBESTA, K.; HORSKA, K.; VANKOVA, J. Inhibition of de novo RNA synthesis by insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galechiae*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication*. v.34, p.1786-1791, 1968.

SILVA, C. C. A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.24, p. 68-72, 2002.

SHI, Y.; XU, W.; YUAN, M.; TANG, M.; CHEN, J.; PANG, Y. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *Journal of applied Microbiology*. v.97, p.757-765, 2004.

SMITH, R. A.; COUCHE, G. A. The phyllophane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied Viron Microbiology*. v.57, cap.1, p.311-315, 1991.

SILVA- WERNECK, J. O. ;JUNIOR, E. F. S.; EVANGELISTA, L. S.; SILVA, T. A. L.; VALDEZ, V. R.; MONNERAT, R. G. Identificação de proteínas VIP3 em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para lepidópteros-praga. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, DF, p.1-20, [Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento], 2008.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Taxonomia e Morfologia parasitária; Ectoparasitas facultativos e vetores artrópodes *In: Parasitologia Veterinária*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, vol.3, cap. 11, p. 571-634, 2007.

TEIXEIRA, A. F. M.; AMARO FILHO, A. A.; QUINTAES, B. R.; SANTOS E. C. L.; SURLIUGA, G. C. Controle de mosca doméstica em área de disposição de resíduos sólidos no Brasil. v.13, p.365-370, 2008.

TREMILIOS, L. M. M.; NEVES, M. C.; VIEIRA, V. C.; BERGAMASCO, V. V.; POLANCZYK, R. A.; LEMOS, M. V. F. Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Científica*, Jaboticabal, v.36, p.86-96, 2008.

WANG, J.X.; ZHAO, X.F.; LIANG, Y.L.; LI, L.; ZHANG, W.; REN, Q.; WANG, L.C.; WANG, L.Y. Molecular characterization and expression of the antimicrobial peptide defensin from the housefly (*Musca domestica*). *Cellular and Molecular Life Sciences*. v.63, p.3072–3082, 2006.

WIGGLESWORTH, V.B. Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*. *Journal of Insect Physiology*. v.19, p.831-844, 1972.

WIGGLESWORTH, V.B. Secretory activities of plasmatocytes and oenocytoids during the moulting cycle in an insect (*Rhodnius*). *Tissue Cell*. II. p.69-78, 1979.

YARA, K.; KUNIMY, Y.; IWAHANA, H. Comparative studies of growth characteristic and competitive ability in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil. *Applied Entomology and Zoology*. v.32, p.625-634, 1997.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Advanced Biotechnology Processes*. v.3, p.315–343, 1984.

ZIMMER, C. R.; CASTRO, L. L. D.; PIRES, S. M.; MENEZES, A. M. D.; RIBEIRO, P. B.; LEITE, F. P. L. Efficacy of entomopathogenic bacteria for control of *Musca domestica*. *Journal Invertebrate Pathology*. v.114, p.241-244, 2013.

