

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Fungos Entomopatogênicos no Controle do *Alphitobius Diaperinus*
(Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) como Estratégia de
Biosseguridade na Avicultura**

Sabrina Rita da Fonseca Rezende

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DO
ALPHITOBIOUS DIAPERINUS (Panzer) (Coleoptera:
Tenebrionidae) COMO ESTRATEGIA DE BIOSSEGURIDADE
NA AVICULTURA**

SABRINA RITA DA FONSECA REZENDE

Sob a orientação do Professor
Fernando Augusto Curvello

e Co-orientação do Professor
Marcelo Elias Fraga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

SABRINA RITA DA FONSECA REZENDE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM _____.

Fernando Augusto Curvello. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Elmiro Rosendo do Nascimento. Dr. UFF

Augusto Vidal da Costa Gomes. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra à minha família, que ao longo de minha vida sempre me apoiou e me proporcionou oportunidades de crescimento pessoal sempre incentivando e apoiando minhas decisões e pelo amor, carinho, que sempre me dedicaram e por tudo que hoje sou.

À minha mãe **Silvina da Fonseca Rezende** e ao meu pai **Gilvandre de Castro Rezende**, dedico todas as minhas conquistas pessoais, pois fizeram de suas vidas uma grande luta para me proporcionar a educação.

Às minhas irmãs **Samantha da Fonseca Rezende e Camilla da Fonseca Rezende**, amigas de todas as horas, sempre incentivadoras de meus ideais.

A **Deus**, por ter me dado a oportunidade e força para realizar este trabalho.

Ao **Orientador e Amigo Fernando Augusto Curvello** pela valiosa ajuda tornando possível a realização deste trabalho e por todos os conhecimentos adquiridos ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me dado esta oportunidade, por nunca ter me deixado fraquejar, mesmo nos momentos de maior agonia, e enfim, agora, concretizá-la.

Aos meus pais, **Silvina da Fonseca Rezende** e **Gilvandre de Castro Rezende** pelo incentivo, pela compreensão e, principalmente por acreditar que eu sou capaz, por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio sentimental e por estarem sempre disponíveis a ajudar, acreditando que o maior bem que poderiam deixar seria o conhecimento.

A minha irmã **Samantha da Fonseca Rezende**, pelo incentivo e apoio nas horas necessárias.

A minha irmã **Camilla da Fonseca Rezende**, pelos almoços maravilhoso, pela companhia nas horas mais difíceis, mais felizes e divertidas (chopadas, trotes, festas...)

A minha avó **Terezinha**, as minhas madrinhas **Lalad** e **Cadi** e meus **Tios e Primos** que sempre estiveram junto a mim em pensamento e oração. Agradeço por todas as conversas e pelo grande carinho e amor com que sempre me trataram.

A amiga **Nelcina**, por me ajudar nessa etapa da minha vida, por todo apoio e incentivo.

Ao **Regys Barbosa Menezes**, pelo amor, amizade, alegria, compreensão, dedicação e colaboração que foram essenciais para realização deste trabalho.

As amigas do alojamento de Graduação F2-206: **Ana Paula, Priscila, Ana Helena, Bia**.

Aos moradores e amigos do alojamento da Pós-graduação da UFRRJ: **Ana Paula Magalhães, Kenia, Almira, Danúbia Gonçalves, Fernanda Delgado, Gislanne, Ariane, Eliane Morgado, Renata Scarlato, Leandro Galzerano, Henrique Trevissan, Arley**, por ter tornado esses dias menos difíceis.

Em especialíssimo, as companheiras e amigas **Thaíz Cedro, Daniele Rossin** e **Patrícia Barizon**, pela amizade de tantos anos, pelas palavras de incentivo e dedicação.

Ao **Gabriel P. R. Gonçalves** por todo carinho, amizade, apoio e ajuda na etapa final para realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Fernando Augusto Curvello**, pelos ensinamentos, compreensão, amizade e a orientação neste trabalho e na vida, meu sincero respeito, reconhecimento e gratidão.

A **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, pela oportunidade de concluir o curso de Pós-Graduação e acolhimento.

Ao **Corpo Docente** do Curso de Pós-graduação em Zootecnia, pelos ensinamentos.

Ao **Instituto de Zootecnia**, pela realização deste trabalho.

Ao amigo **Frank Sarubi**, sempre muito atencioso e solícito.

Ao amigo **Jonas**, pela atenção e amizade.

Ao professor **Marcelo Elias Fraga**, pelo incentivo na realização de deste projeto.

Ao **Alzimiro Marcelo Conteiro Castilho** pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos professores **Augusto Vidal da Costa Gomes** e **Cristina Amorim Ribeiro de Lima** pela orientação, paciência e estímulo.

Aos Professores Doutores **Mirton Morenz** e **Rosana Reis** pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores **Walter Leira Teixeira Filho** e **Carlos Wilson Gomes Lopes** pela grande ajuda na realização deste projeto.

Aos funcionários **Fátima**, **Pedro** e **Valdecir**, pelo auxílio na condução do experimento.

Aos funcionários **Fernando** e **Luis** pela ajuda na fabricação das rações experimentais.

Aos funcionários e amigos do Projeto Sanidade Animal, **Luís Jorge Soares** e **Valcir de Oliveira Pires**, que contribuíram para a execução deste projeto.

Aos amigos da UFRRJ, pela amizade e momentos de alegria.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho e para minha formação.

E, à todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho.

À todos os meus familiares, por acreditarem em mim.

E mais uma vez, à Deus, por colocar cada uma dessas pessoas no meu caminho e tornar tudo isso possível.

BIOGRAFIA

Sabrina Rita da Fonseca Rezende, filha de Gilvandre de Castro Rezende e Silvina da Fonseca Rezende, nascida em 24 de abril de 1982, em Foz do Iguaçu, Paraná.

No ano de 2001 ingressou no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, Faculdade de Ciências da Saúde de Juiz de Fora, colando grau e obtendo o título de Licenciatura em Ciências Biológicas em 2005.

Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica no Lemos Laboratório de Análises Clínicas S/C LTDA nos anos de 2002 a 2003. Desenvolveu atividades nos setores de Imunologia, Hormônios, Microbiologia, Urinálise, Parasitologia, Bioquímica e Hematologia. Bolsista de Iniciação Científica na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite junto ao laboratório de microbiologia do leite no período de 2003 a 2005 onde pode desenvolver projetos na área de microbiologia do leite.

Depois de formada lecionou biologia no Curso Star Pré-Vestibular de 2004 a 2005, responsável pelas disciplinas de citologia, citoquímica, ecologia e genética.

Foi responsável técnico pelo criatório de avestruz “Sertão do Avestruz” e criatório de cabras “Cabras do Sertão” no período de 2004 a 2006.

Em agosto de 2006 foi aprovada no Processo de Seleção para o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, nível Mestrado, do Instituto de Zootecnia desta Instituição, sob a orientação do Professor Dr. Fernando Augusto Curvello e co-orientação do Professor Dr. Marcelo Elias Fraga.

Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

RESUMO

REZENDE, Sabrina Rita da Fonseca. **Fungos entomopatogênicos no controle do *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) como estratégia de biossegurança na avicultura**. 2009. 46 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Objetivou - se com este trabalho avaliar a ação *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp.. e sua entomopatogenicidade no controle do *Alphitobius diaperinus* conhecido como “cascudinho”. Buscou-se também avaliar a inocuidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em frangos de corte avaliada por desempenho da produtividade, análises hematológicas e histopatológicas. No primeiro ensaio larvas e adultos de cascudinho foram inoculados com suspensões de conídios das três espécies de fungos, na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹ e observadas por um período de dez dias. Os resultados foram submetidos ao teste do Qui-Quadrado (χ^2), onde pode se observar uma maior mortalidade dos besouros para o isolado de *B. bassiana* em comparação com os isolados de *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp., quando verificou-se que larvas foram mais suscetíveis do que os adultos. Face a esses resultados, foi avaliada a entomopatogenicidade de *B. bassiana* por inoculação de 200 larvas e 200 insetos adultos com suspensões de conídios nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹. Os insetos foram observados durante dez dias, e os resultados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. A mortalidade nas larvas foi significativa a partir do quarto dia com a menor concentração, e a mortalidade nos adultos somente foi significativa a partir do quinto dia na concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹. No teste de inocuidade foram utilizados 240 frangos de corte da linhagem comercial Cobb, alojados em baterias metálicas com vinte e quatro compartimentos de 0,90 x 0,85 x 0,40 metros. A distribuição das aves foi inteiramente casualizada e os tratamentos distribuídos em um delineamento experimental em blocos ao acaso, contando com quatro tratamentos e seis repetições, onde foram aplicados os seguintes programas: T1 – controle (solução salina + tween); T2 – suspensão com 10^6 conídios.mL⁻¹; T3 – suspensão com 10^7 conídios.mL⁻¹; T4 – suspensão com 10^8 conídios.mL⁻¹. A inoculação ocorreu no 14° e 28° dia de vida das aves e para cada tratamento foi utilizado 0,5 mL para inoculação oral e uma gota para inoculação nasal. Os resultados foram analisados com base na análise de variância, e as médias comparadas por teste de Newman-Keuls, a 5 % de probabilidade. Não houve diferenças estatísticas no ganho de peso e no consumo de ração entre os tratamentos, embora na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ tenha ocorrido menor ganho

de peso em relação a concentração 10^6 conídios.mL⁻¹. Nesta concentração a conversão alimentar foi estatisticamente igual ao controle, com resultados piores que os demais tratamentos. Não houve diferença estatística para viabilidade. Os resultados quanto ao rendimento de carcaça, pesos absolutos e relativos do coração e fígado, não foram influenciados significativamente pelas concentrações de fungos. No hemograma foi observado aumento significativo do número de leucócitos totais (leucocitose) para o grupo que recebeu a maior concentração de fungo. Em relação ao leucograma, pode-se observar diferença estatística, com aumento significativo do número de leucócitos totais, linfócitos, heterófilos e monócitos, para a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹. Os resultados histopatológicos não revelaram presença de lesões aparentes no pulmão e na bursa de Fabrício, em nenhuma das concentrações de fungos testadas. Todavia, a análise histopatológica do fígado revelou necrose de coagulação focal e infiltrado leucocitário constituído por heterófilos e células mononucleadas, principalmente em torno dos ductos biliares, os quais não apresentaram lesões aparentes e arranjo celular dentro dos padrões de normalidade. Estas lesões foram moderadas no tratamento com a concentração 10^7 e mais acentuadas no tratamento com a concentração 10^8 . Os estudos mostram a eficiência do isolado de *Beauveria bassiana* no controle do *Alphitobius diaperinus*, indicando ser este um fungo promissor no controle da praga, embora mais eficiente no controle das larvas. Embora não tenha ocorrido alteração substancial, as pequenas alterações histopatológicas e hematológicas podem ter sido decorrentes do severo desafio a que foram submetidos. Indicando uma possível relação dose-efeito do produto biológico. Entretanto, são ainda necessários mais estudos para definir de forma mais precisa a aplicação deste agente de controle no manejo do cascudinho, levando sempre em consideração a relação custo-benefício.

Palavras-chave: *Alphitobius diaperinus*. Frango de corte. Fungos entomopatogênicos.

ABSTRACT

REZENDE, Sabrina Rita da Fonseca. **Entomopathogenic fungi control of the *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) as a biosecurity strategy in poultry production.** 2009. 46 p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The objective of this study was to assess the action in vitro of isolates of *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp. and *Trichoderma* sp. and control their entomopathogenic *Alphitobius diaperinus* known as "lesser mealworm." The objective was also to evaluate the safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in broiler performance measured by productivity, hematological and histological analysis. In the first test of lesser mealworm larvae and adults were inoculated with conidia suspensions of the three species of fungi, at concentration of 10^7 conidios.mL⁻¹ and observed for a period of ten days. The results were submitted to the chi-squared (χ^2), which could be observed a higher mortality of beetles for strain of *B. bassiana* compared with the strains of *Cladosporium* sp. and *Trichoderma* sp. These results also showed that the larvae were more susceptible than the adults. Faced with these results, an assessment was made of entomopathogenic *B. bassiana* by inoculation of 200 insect larvae and 200 adults with suspensions of conidia at concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 conidios.mL⁻¹. The insects were observed for ten days, and the results submitted to analysis of variance and the averages compared by the Kruskal-Wallis test at 5% significance. The mortality in the larvae was significant after the fourth day with the lowest concentration, and mortality was significant only in adults after the fifth day in the concentration of 10^8 conidios.mL⁻¹. In the safety test were used 240 broiler chickens from the commercial line Cobb, housed in metal batteries with twenty-four compartments of 0.90 x 0.85 x 0.40 meters. The distribution of birds was completely random and treatments were distributed in an experimental design in randomized blocks, with four treatments and six replications: T1 - control (saline + tween), T2 - suspension with 10^6 conidios.mL⁻¹, T3 - suspension with 10^7 conidios.mL⁻¹, and T4 - suspension with 10^8 conidios.mL⁻¹. The inoculation was performed on the 14th and 28th days of age and each treatment used 0.5 mL for oral inoculation and a drop for nasal inoculation. The results were analyzed based on the analysis of variance, and

the averages compared by Newman-Keuls test, with 5% significance. There were no statistical differences in weight gain and feed intake between treatments, although in the 10^8 conidios.mL⁻¹ concentration occurred a lower weight gain compared to 10^6 concentration conidios.mL⁻¹. At this concentration, the feed conversion was equal to control, with lower results than the other treatments. There was no statistical difference for viability. Regarding weight gain, the absolute and relative heart and liver weights were not significantly affected by concentrations of fungi. The blood evaluation showed significant increase in the total number of leukocytes (leukocytes) in the group that received the highest concentration of fungus. Compared to white blood cell, there was statistical difference, with increase in the total number of leukocytes, lymphocytes, monocytes and heterophils at the concentration 10^8 conidios.mL⁻¹. The histopathological analysis revealed no apparent lesions in lungs and Fabricius' bursa, at any concentrations of fungi tested. However, the histopathological analysis revealed liver necrosis with focal coagulation and infiltrated leukocyte presenting heterophils and mononuclear cells, mainly around the bile duct, which showed no apparent injuries and cellular arrangement within the normal range. These lesions were moderate at the concentration 10^7 and more pronounced at 10^8 . Studies show the efficiency of *Beauveria bassiana* isolated in the control of *Alphitobius diaperinus*, indicating that the *B. bassiana* is a promising fungus on pest control, although more efficient in larvaecontrolling. Although no substantial change has occurred, the small hematological and histopathological changes may have caused the severe challenge they have suffered, indicating a possible dose-effect relationship of organic product. However, further studies are still needed to define more precisely the application of this control agent in the management of lesser mealworm, always considering the cost-benefit ratio.

Key words: *Alphitobius diaperinus*. Broiler. Entomopathogenic fungi.

INDICE DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1.	Mortalidade <i>in vitro</i> de larvas de <i>Alphitobius diaperinus</i> após aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Cladosporium</i> sp.	14
Tabela 2.	Mortalidade <i>in vitro</i> de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> após aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Cladosporium</i> sp.	14
Tabela 3.	Mortalidade (%) <i>in vitro</i> de larvas de <i>Alphitobius diaperinus</i> tratadas com <i>Beauveria bassiana</i>	17
Tabela 4.	Mortalidade (%) <i>in vitro</i> de <i>Alphitobius diaperinus</i> adultos tratados com <i>Beauveria bassiana</i>	17

CAPITULO II

Tabela 1.	Composição percentual e química das rações.....	33
Tabela 2.	Escores de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão apresentado.....	35
Tabela 3.	Ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) viabilidade (V) de frangos de corte do 1º ao 38º dia de idade, tratados com <i>Beauveria bassiana</i>	36
Tabela 4.	Características de carcaça e desenvolvimento de vísceras de frangos de corte aos 38 dias de idade.....	38
Tabela 5.	Médias e desvios padrões dos valores médios do hemograma avaliados em função das diferentes concentrações de <i>Beauveria bassiana</i>	38
Tabela 6.	Valores médios e desvios padrões do leucograma avaliados em função das diferentes concentrações de <i>Beauveria bassiana</i>	41

INDICE DE QUADROS

CAPITULO II

Quadro 1.	Grau de lesão nos órgãos em função das diferentes concentrações de <i>Beauveria bassiana</i>	41
-----------	--	----

INDICE DE FIGURA

CAPITULO I

Figura 1.	A) Coleta dos <i>Alphitobius diaperinus</i> ; B) Adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> ; C) Larvas <i>Alphitobius diaperinus</i>	10
Figura 2.	A) Isolados de <i>Beauveria bassiana</i> ; B) Isolados de <i>Trichoderma</i> sp. e C) Isolados de <i>Cladosporium</i> sp. em meio BDA.....	10
Figura 3.	A) Imersão dos insetos nas suspensões. B) Transferência dos insetos para placa de Petri. C) Insetos em placa de Petri.....	11
Figura 4.	A) Larva tratada com <i>Beauveria bassiana</i> . B) Adulto tratado com <i>Beauveria bassiana</i>	12
Figura 5.	A) Adulto de <i>Alphitobius diaperinus</i> infectado por <i>Beauveria bassiana</i> ; B) Larvas de <i>Alphitobius diaperinus</i> infectado por <i>Beauveria bassiana</i> ; C) Larva de <i>Alphitobius diaperinus</i> infectada por <i>Cladosporium</i> sp.....	15

CAPITULO II

Figura 1.	A) Círculo de proteção com campânula à gás. B) Bebedouros infantis do tipo copo (2,5L cada) e comedouros tipo bandeja.....	29
Figura 2.	A) Baterias metálicas. B) Pesagem das aves ao 7 dias. C) Bebedouro e comedouro tipo calha.....	30
Figura 3.	A) Inoculação da suspensão de <i>Beauveria bassiana</i> via nasal. B) Inoculação da suspensão de <i>Beauveria bassiana</i> via oral.....	31
Figura 4.	A) Swab da cloaca da ave. B) Tubo de ensaio com o Swab. C) Inoculação do Swab no meio de cultura.....	31
Figura 5.	A) Gotejamento das aves. B) Pesagem da carcaça quente.....	32
Figura 6.	Corte histológico de fígado de frango de corte aos 38 dias de idade inoculados por <i>Beauveria bassiana</i>	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	04
CAPÍTULO I - PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE <i>ALPHITOBIOUS DIAPERINUS</i> (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)	05
Resumo	06
Abstract	07
1 INTRODUÇÃO	08
2 MATERIAL E MÉTODOS	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4 CONCLUSÕES	20
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II – RESPOSTAS DE FRANGOS DE CORTE Á INOCULAÇÃO DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	24
Resumo	25
Abstract	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4 CONCLUSÕES	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
3 CONCLUSÕES GERAIS	46

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está consolidado pela alta produtividade da atividade agropecuária, dentro da qual a avicultura de corte vem se destacando no cenário internacional, representando um importante segmento agroindustrial, sendo uma das atividades mais dinâmicas e avançadas tecnologicamente. Qualidade e baixos custos são fatores que colocam o Brasil como o 3º maior produtor de carne de frango e o 1º maior exportador de carne de frango do mundo (UBA, 2009).

Segundo dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção global de carne de frangos em 2008 está prevista em 74,237 milhões de toneladas. O USDA prevê que a produção brasileira cresça 10,8% no ano de 2008 com uma projeção para 11,417 milhões de toneladas em relação a 2007, quando atingiu 10,305 milhões de toneladas (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2009).

Entre janeiro e outubro de 2008 as exportações de carne de frango totalizaram embarques de 3,1 milhões de toneladas, registrando um crescimento de 17% na comparação com o mesmo período de 2007. Nesses 10 meses de 2008 a receita cambial somou US\$ 6 bilhões, o que representa um aumento de 54% na mesma comparação (ABEF, 2008).

Este crescimento tem estimulado práticas de manejo como o aumento do número de aves por metro quadrado de alojamento, aumento do número de lotes sobre a mesma cama e intervalos entre lotes algumas vezes reduzido. Esses fatores parecem contribuir para a multiplicação de microrganismos e para o aumento populacional de insetos.

Nos sistemas atuais de criação de frangos de corte, as práticas de manejo aliadas às formas de confinamento favorecem a ocorrência de uma das espécies que melhor se adaptou aos aviários: o *Alphitobius diaperinus*, (Panzer 1797), conhecido popularmente como cascudinho (PAIVA, 2000), tornando-se praga de grande importância em aviários industriais.

O aviário necessita de uma série de condições para conforto dos animais, tais como temperatura, umidade, ventilação, água e alimento apropriado, favorecendo a permanência e desenvolvimento desses insetos. Segundo Chernaki e Almeida (2001), o ciclo total de *A. diaperinus* à temperatura constante de 28°C é de 42,5 dias, o que indica que a cada novo lote de frangos ocorre uma nova geração de insetos, podendo cada fêmea produzir mais de 2 mil ovos (STEELMAN, 1996).

O comportamento de *A. diaperinus* também predispõe a um aumento populacional, devido à sua permanência a cada troca de cama. Com isto, já no primeiro lote, é registrado um alto nível de infestação, que tende aumentar de lote a lote (MATIAS, 1992).

O cascudinho é responsável por diversos problemas que afetam direta ou indiretamente as aves, servindo de alimento alternativo para as aves, o que diminui o consumo de ração, resultando em perda no ganho de peso quando comparadas às aves que se alimentam normalmente (MATIAS, 1992). Outros problemas estão associados a esses insetos, como por exemplo, adultos e larvas são capazes de perfurar a pele da ave, com suas mandíbulas, na base dos pés, onde se alimentam do exsudato sanguíneo. Constitui-se em reservatório de patógenos de fundamental importância para avicultura, como bactérias, vírus, fungos, protozoários e platelmintos parasitos prejudiciais às aves (DESPINS *et al.*, 1994; DESPINS e AXTELL, 1995; MCALLISTER *et al.*, 1995).

Uma possibilidade de controle, citada pela literatura atual é o controle microbiano, isto é, o uso de seres vivos para controlar pragas, uma vez que utiliza inimigos naturais para manter a população a ser controlada abaixo dos níveis que caracterizam dano econômico, evitando ao mesmo tempo, abalos ambientais oriundos do uso inadequado de inseticidas químicos.

Neste âmbito, fungos entomopatogênicos são recomendados em programas de controle biológico devido ao fato de se comportarem freqüentemente como inimigos naturais de uma grande variedade de artrópodes, além de possuírem um grande potencial de dispersão, são especializados em infectar seus hospedeiros através de conídios que se fixam para germinar e penetrar no tegumento (WHITTAKER, 1969). Tais microorganismos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle biológico de artrópodes.

De acordo com Chandler *et al.* (2000), uma vez estabelecida a interação entre fungos entomopatogênicos e artrópodes, o patógeno se multiplica nos tecidos moles do hospedeiro, provocando sua morte por septicemia o período compreendido entre três a dez dias após a infecção, por provocar perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos graves e ação de toxinas específicas inerentes ao fungo (CONNOLLY, 1969). Outra vantagem deste tipo de controle é a grande variabilidade genética observada na biologia destes patógenos, favorecendo com isso o surgimento de novas espécies em resposta às modificações do ambiente durante o processo evolutivo (ALVES, 1998).

Resultados oriundos de aplicações *in vitro* demonstram percentuais de eficácia interessantes, tendo como objetivos principais selecionar as cepas fúngicas mais virulentas e elucidar a importância das condições ambientais necessárias à manutenção de sua eficácia em aplicações a campo. Estudos voltados ao conhecimento da patogenicidade a artrópodes, comprovam como sendo os fungos os mais promissores bioagentes, tornando-os organismos capacitados para o uso em controle de artrópodes vetores de importantes doenças (ALVES,

1998). Buscou-se avaliar a ação de fungos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp.) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Bem como avaliar a inocuidade de *Beauveria bassiana* sobre o desempenho, hematologia e histopatologia de frangos de corte.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEF. <http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.php>: Capturado em 04 dez. 2008
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, p. 289-381, 1998.
- AVICULTURA INDUSTRIAL. http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=36395&tipo_tabela=negocios&categoria=estatisticas: Capturado em 08 jan. 2009
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K. & SUNDERLAND, K. D. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Science and Technology*, v. 10, p. 357-384, 2000.
- CHERNAKI, A.M. & L.M. ALMEIDA. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, p. 351-363, 2001.
- CONNOLE, M. D. Effect of fungal extracts on the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*, v. 45, p. 207, 1969.
- DESPINS, J.L.; AXTELL, R.C.; RIVES, D.V.; GUY, J.S.; FICKEN, M.D. Transmission of enteric pathogens of turkeys by darkling beetle larva (*Alphitobius diaperinus*). *Journal of Applied Poultry Research*, v. 3, p. 61-65, 1994.
- DESPINS, J.L.; AXTELL, R.C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poultry Science*, v. 74, p. 331-336, 1995.
- MATIAS, R.S. Controle *Alphitobius diaperinus* em piso de cama de aviários. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 205-207, 1992.
- MCALLISTER JC, STEELMAN CD, NEWBERRY LA, SKEELES JK. Isolation of Bursal Disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poultry Science*, v. 74, p. 45-9. 1995.
- PAIVA, D.P. Controle de moscas e cascudinhos. Desafios na produção agrícola. In: simpósio sobre resíduos da produção avícola, 2000, Concórdia, SC. *Anais...* Concórdia: Embrapa de Suínos e Aves, 2000.
- STEELMAN, D. Darkling beetles are costly pests. *Poultry Digest*, v. 55, p. 22-23. 1996.
- UBA. <http://www.uba.org.br>: Capturado em 12 jan. 2009
- WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, v. 163, p. 150-160. 1969.

CAPÍTULO I

PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE *ALPHITOBIOUS DIAPERINUS* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)

RESUMO

O besouro *Alphitobius diaperinus* (Panzer) popularmente conhecido como cascudinho, é considerado uma importante praga da avicultura mundial. Por suas características comportamentais e hábitos biológicos que dificultam seu controle, se constitui em importante vetor de agentes patogênicos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação *in vitro* de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp.. no controle do cascudinho. Larvas e adultos foram inoculados com suspensões de conídios das três espécies de fungos, na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹, e observados por um período de dez dias. Os resultados foram submetidos ao teste do Qui-Quadrado (χ^2), onde pode se observar uma maior mortalidade dos besouros para o isolado de *B. bassiana* em comparação com os isolados de *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp., quando verificou-se que as larvas foram mais suscetíveis do que os adultos. Em face de esses resultados, foi avaliada a entomopatogenicidade de *B. bassiana* por inoculação de 200 larvas e 200 insetos adultos com suspensões de conídios nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹. Os insetos foram observados durante dez dias e os resultados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. A mortalidade nas larvas foi significativa a partir do quarto dia com a menor concentração, e a mortalidade dos adultos somente foi significativa a partir do quinto dia na concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹. Os estudos mostram a eficiência do isolado de *Beauveria bassiana* no controle do *Alphitobius diaperinus*, indicando ser este um fungo promissor no controle da praga, embora mais eficiente no controle das larvas. Entretanto, são ainda necessários mais estudos para definir de forma mais precisa a aplicação deste agente de controle no manejo do cascudinho, levando sempre em consideração a relação custo-benefício.

Palavra-chave: Cama de frango. *Alphitobius diaperinus*. *Beauveria bassiana*. *Cladosporium* sp.. *Trichoderma* sp.

ABSTRACT

The beetle *Alphitobius diaperinus* (Panzer), popularly known as lesser mealworm, is considered a worldwide pest for the poultry industry. Their biological characteristics and behavioral habits difficult their control and constitute an important vector of pathogens. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* effect from isolates of *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp. and *Trichoderma* sp. in the biological control of the lesser mealworm. Larvae and adults of *A. diaperinus* were inoculated with suspensions of 10^7 conidias.mL⁻¹ and observed during ten days. The results were submitted to qui-squared test (χ^2), where it was observed a greater mortality of *B. bassiana* beetles compared to strains of *Cladosporium* sp. and *Trichoderma* sp. being the larvae more susceptible than adults. Considering these results, *B. bassiana* entomopathogenicity was further evaluated with 200 larvae and 200 adult insects with suspensions of conidia at concentrations of 10^6 , 10^7 and 10^8 conidias.mL⁻¹. The insects were observed during ten days and the results were submitted to analysis of variance and the averages compared by Kruskal-Wallis test at 5% significant. The larvae mortality with the lowest concentration was significant starting at day four, and the adult mortality was only observed in the sixth day with the concentration of 10^8 conidia.mL⁻¹. Studies show the efficiency of *Beauveria bassiana* isolate in the control of *Alphitobius diaperinus*, indicating that the *B. bassiana* is a promising fungus on pest control, although more efficient in larvae controlling. However, further studies are still needed to define more precisely the application of this control agent in the management of lesser mealworm, always considering the cost-benefit ratio.

Key words: Poultry litter. *Alphitobius diaperinus*. *Beauveria bassiana*. *Cladosporium* sp.. *Trichoderma* sp.

1 INTRODUÇÃO

O besouro *Alphitobius diaperinus* Panzer, conhecido como cascudinho, pertence ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Coleóptera e Família Tenebrionide (PAIVA, 2000). Constitui-se hoje num dos grandes problemas da avicultura mundial e, embora seja conhecido como praga secundária de farinhas, rações e derivados de grãos armazenados, adaptou-se às condições dos aviários, sendo encontrado em alta densidade, colonizando a cama de frango nas granjas avícolas onde se alimenta de ração, fezes e animais mortos.

Esse coleóptero tem sido responsável por grandes prejuízos econômicos na avicultura, uma vez que as aves ciscam a cama e acabam por se alimentar do cascudinho, o que reduz o consumo de ração balanceada, alterando significativamente a conversão alimentar e afetando o desenvolvimento inicial das aves (MATIAS, 1992). Ao ingerirem esses coleópteros, as aves também podem sofrer ferimentos no trato digestivo, devido à dureza dos élitros dos insetos adultos (MATIAS, 1992). Além dos prejuízos acima citados, os besouros da Família Tenebrionide, ao serem molestados, liberam uma secreção para se defenderem dos predadores. No caso do *A. diaperinus*, isolou-se dessa secreção, as quinonas, que são substâncias tóxicas e carcinogênicas, que podem levar à lesões hepáticas, determinando, neste caso, a condenação, do órgão no abatedouro, para o consumo (TSENG *et al.*, 1971). Além disso, Elowni e Elbiharis (1979) descreveram que suas larvas lesionam a pele das aves, favorecendo infecções secundárias, o que pode interferir na qualidade da carne e saúde das aves.

Os cascudinhos abrigam e são potenciais transmissores de bactérias, vírus, fungos, protozoários e platelmintos, parasitos prejudiciais às aves (DESPINS *et al.*, 1994; DESPINS e AXTELL, 1995; MCALISTER *et al.*, 1995). Segundo De Las Casas *et al.* (1972), este inseto é o vetor do vírus da leucose aviária, tendo sido encontrado em seu interior colônias de bactérias como *Streptococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, além de fungos como *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus* e *Candida* sp.. Dentre os vírus, isolados de *Alphitobius diaperinus*, foram descritos os causadores da doença de Gumboro, leucose, doença de Marek, Newcastle e rotavírus (EIDSON *et al.*, 1966; DE LAS CASAS *et al.*, 1973). Oocistos de *Eimeria* spp. podem sobreviver na cama de frango e serem ingeridos por *A. diaperinus*, e assim serem consumidos regularmente pelas aves (REYNA *et al.*, 1983; APUYA *et al.*, 1994). A transmissão destes patógenos ocorre quando as aves ingerem larvas e adultos de *A. diaperinus* infectados.

Alphitobius diaperinus pode danificar os sistemas de isolamento térmico de galpões climatizados, ao perfurar o material isolante, podendo dificultar a obtenção do conforto térmico e prejudicar seriamente o desenvolvimento inicial das aves, com resultados insatisfatórios no ganho de peso ou na produção de ovos (TURNER, 1986).

A limpeza freqüente do aviário, com remoção da cama após a retirada dos animais, é uma das formas de se reduzir o número de insetos, embora seja onerosa e trabalhosa (STEELMAN, 1996). Estratégias para o controle da praga tornam-se assim infrutíferas, já que a maioria está baseada na utilização de inseticidas químicos de curto período residual, cuja utilização é limitada pela presença constante das aves nos aviários e, ainda que eficientes, constituem-se em risco para os operadores e para a própria ave. Além disso, os hábitos desses insetos diminuem a eficiência das aplicações, pois as mesmas são feitas apenas na superfície da cama (ALVES, 1998).

A necessidade de se reduzirem os impactos ambientais, causados pelo uso excessivo de agrotóxicos e riscos à segurança no trabalho, têm motivado estudos de formas alternativas para controle de pragas e, dentre elas, o controle biológico, baseado em entomopatogênicos, apresenta-se viável, principalmente pela segurança em relação às aves. Entretanto, os microrganismos entomopatogênicos têm se mostrado inócuo aos animais homeotérmicos, além de não oferecerem riscos ao produtor e ao meio ambiente. Soma-se a isso a maior permanência desses organismos no ambiente em comparação aos produtos químicos (CRAWFORD *et al.*, 1998).

Os fungos Entomopatogênicos são organismos com grande potencial para o controle de pragas devido à capacidade de supressão de populações de artrópodes. Excetuando-se *Beauveria bassiana*, não existem evidências na literatura sobre a eficiência da aplicação de suspensões de conídios de *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. no controle de *Alphitobius diaperinus*, no entanto, a comprovada ação desses fungos no controle de algumas pragas de vegetais podem indicar uma potencialidade para sua aplicação no controle do cascudinho na avicultura.

No presente trabalho objetivou-se avaliar a ação dos fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. no controle de “cascudinho” *Alphitobius diaperinus* (Panzer) e a quantificação da entomopatogenicidade de *B. bassiana* sobre *A. diaperinus*.

2 MATERIAL E METODOS

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Micologia do Projeto Sanidade Animal (PSA) convênio entre a UFRRJ e EMBRAPA, localizado no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

Os insetos foram coletados em camas de frangos de corte em galpões avícolas comerciais de uma empresa verticalizada localizada no Estado do Rio de Janeiro e transportados até o laboratório em baldes plásticos vedados com tela.

No laboratório realizou-se a limpeza mecânica das amostras, para eliminação de material contaminado como penas, fezes e ração, além de outros insetos e também com o objetivo de separar o cascudinho adulto das larvas, que por sua vez foram selecionadas com aproximadamente um centímetro de comprimento (Figura 1).



Figura 1. A) Coleta dos *Alphitobius diaperinus*. B) Adultos de *Alphitobius diaperinus*. C) Larvas de *Alphitobius diaperinus*.

2.1 Procedência dos isolados

Foram utilizados três espécies de fungos, o isolado 12 de *Beauveria bassiana* (obtido de *A. diaperinus*), o isolado 08 de *Trichoderma* sp. (obtidos de amostras de solo) e o isolado 13 de *Cladosporium* sp. (obtido de “pulgão”), provenientes da coleção da PESAGRO - Rio de Janeiro – EES (Estação Experimental de Seropédica), armazenados em tubos de ensaio contendo meio BDA (batata / dextrose / agar), (Figura 2).



Figura 2. A) Isolados de *Beauveria bassiana*. B) Isolados de *Trichoderma* sp. e C) Isolados de *Cladosporium* sp em meio BDA.

2.2 Teste de Patogenicidade

As culturas fúngicas de *B. bassiana*, *Trichoderma* sp. e *Cladosporium* sp. foram multiplicadas em tubos contendo meio de cultura BDA (ALVES *et al.*, 1998), incubadas em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), por um período de sete dias. Após este período, os conídios foram coletados, raspando-se a cultura com o auxílio de uma alça e transferidos para Erlenmeyer de 250 mL contendo solução salina a 0,85 % de NaCl + 0,1% de Tween 80. A quantificação dos conídios foi realizada em microscópio óptico utilizando o terceiro campo da câmara de Neubauer, que compreendia uma área de $0,0400 \text{ mm}^2$. O número médio de conídios contados em 5 destes campos (n) foi multiplicado pelo fator fixo desse campo ($n \times 2,5 \times 10^5$), calculado em função do seu volume, o que determina o número de conídios existentes na suspensão (ALVES e MORAES, 1998). Foram preparadas suspensões de conídios na concentração de 10^7 conídios. mL^{-1} para cada espécie de fungo, constituindo os tratamentos, juntamente com o controle que consistia de solução salina a 0,85 % de NaCl + 0,1% de Tween 80.

Nos bioensaios foram utilizados 320 insetos, 160 larvas e 160 adultos. Cada um dos quatro tratamentos continha 4 repetições de 10 insetos cada, totalizando 40 cascudinhos adultos e 40 larvas. Os insetos foram transferidos para Becker de 250 mL, previamente esterilizados, onde foram imersos em 1mL de suspensão de 10^7 conídios. mL^{-1} , sendo então agitados manualmente durante 10 segundos, seguindo a técnica de imersão descrita por Loureiro e Monteiro (2005). No tratamento testemunha, os insetos foram imersos em 1mL de solução salina + 0,1% de Tween 80. Em seguida, as larvas e adultos foram transferidos e mantidos em placas de Petri forradas com papel-filtro umedecido com água destilada esterilizada e contendo ração esterilizada para aves, (Figura 3).



Figura 3. A) Imersão dos insetos nas suspensões. B) Transferência dos insetos para placa de Petri. C) Insetos em placa de Petri.

Os recipientes foram mantidos em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Diariamente, durante 10 dias, foi avaliada a mortalidade, sendo os insetos mortos imersos em solução de álcool 70% e posteriormente enxaguados com água destilada, e transferidos individualmente para placas de

Petri forradas com papel-filtro umedecido com água destilada esterilizada e mantidos em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias, para permitir o desenvolvimento e exteriorização do fungo, visando à confirmação do agente causador da doença (Figura 4). As comparações entre os tratamentos foram submetidas a análise do Qui-Quadrado (χ^2), utilizando o programa estatístico SAEG, 2007.

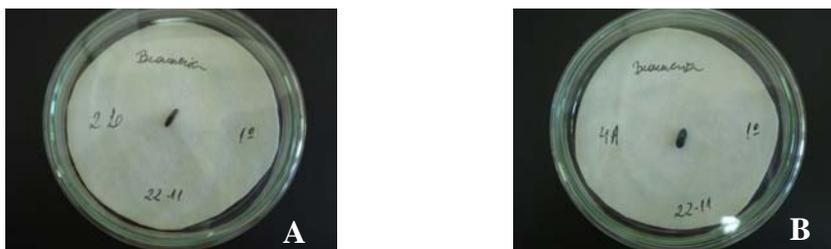


Figura 4. A) Larva tratada com *Beauveria bassiana*. B) Adulto tratado com *Beauveria bassiana*.

2.3 Teste de Virulência

Foi testado o fungo *Beauveria bassiana*, por ter sido aquele que apresentou entomopatogenicidade tanto para larvas como para adultos de *Alphitobius diaperinus*.

As culturas fúngicas foram obtidas a partir dos insetos mortos no teste de patogenicidade que apresentaram exteriorização do fungo. A multiplicação ocorreu em tubos contendo meio de cultura BDA (ALVES *et al.*, 1998), incubadas em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), por um período de sete a dez dias. Após este período, os conídios foram coletados, raspando-se a cultura e transferidos para Erlenmayer 250mL contendo solução salina 0,85 % de NaCl + 0,1% de Tween 80. A quantificação dos conídios foi realizada em microscópio óptico utilizando o terceiro campo da câmara de Neubauer, que compreendiam uma área de $0,0400 \text{ mm}^2$. O número médio de conídios contados em 5 destes campos (n) foi multiplicado pelo fator fixo desse campo ($n \times 2,5 \times 10^5$), calculado em função do seu volume, o que determina o número de conídios existentes na suspensão (ALVES e MORAES, 1998). Foram preparadas suspensões nas concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 conídios.mL⁻¹.

Para cada tratamento, inclusive o controle, foram utilizadas cinco repetições com 10 insetos, totalizando 400 indivíduos, 200 larvas e 200 adultos. Os insetos foram transferidos para Becker de 250 mL, previamente esterilizados onde foram imersos em 1mL de suspensão de conídios na concentração de 10^6 , 10^7 , 10^8 conídios.mL⁻¹, sendo então agitados manualmente durante 10 segundos, seguindo a técnica de imersão descrita por Loureiro e

Monteiro (2005). No grupo controle, os insetos foram imersos em 1mL de solução salina + 0,1% de Tween 80.

Em seguida, larvas e adultos foram transferidos e mantidos em placas de Petri forradas com papel-filtro umedecido com água destilada esterilizada e contendo ração esterilizada para aves. (Figura 3). Os recipientes foram mantidos em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Diariamente, durante 10 dias, foi avaliada a mortalidade, sendo os mortos imersos em solução de álcool 70% e posteriormente enxaguados com água destilada, e transferidos individualmente para placas de Petri forradas com papel-filtro umedecido com água destilada esterilizada, para permitir o desenvolvimento e exteriorização do fungo, visando diagnóstico etiológico (Figura 4). Procedeu-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, utilizando -se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 2007). A CL_{50} (concentração letal para matar 50 % dos indivíduos), foi calculada através do método estatístico de Probit.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de Patogenicidade

Foi observada maior mortalidade para o isolado de *B. bassiana*, quando comparado aos isolados de *Trichoderma* sp. e *Cladosporium* sp. (Tabela 1 e 2). Isso se deve, possivelmente, à especificidade dos patógenos para determinadas espécies de insetos, quando, mesmo se aplicando doses elevadas, não se consegue atingir o hospedeiro (Alves, 1998).

Tabela 1. Mortalidade *in vitro* de larvas de *Alphitobius diaperinus* após aplicação de *Beauveria bassiana*, *Trichoderma* sp, *Cladosporium* sp..

<i>Isolados</i>	<i>Insetos Vivos</i>		<i>Insetos Mortos</i>		<i>Total</i>	
	<i>N</i> ¹	% ²	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Controle	40	0	0	0	40	100
<i>Beauveria bassiana</i>	2	5	38	95	40	100
<i>Trichoderma</i> sp.	39	92,5	1	7,5	40	100
<i>Cladosporium</i> sp.	37	97,5	3	2,5	40	100

Teste Qui-Quadrado (3)= 130,815. ¹ Número de indivíduos; ² Porcentagem de mortalidade

Tabela 2. Mortalidade *in vitro* de adultos de *Alphitobius diaperinus* após aplicação de *Beauveria bassiana*, *Trichoderma* sp, *Cladosporium* sp..

<i>Isolados</i>	<i>Insetos Vivos</i>		<i>Insetos Mortos</i>		<i>Total</i>	
	<i>N</i> ¹	% ²	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Controle	40	0	0	0	40	100
<i>Beauveria bassiana</i>	15	37,5	25	62,5	40	100
<i>Trichoderma</i> sp.	40	100	0	0	40	100
<i>Cladosporium</i> sp.	40	100	0	0	40	100

Teste Qui-Quadrado (3)= 88,889. ¹ Número de indivíduos; ² Porcentagem de mortalidade

A mortalidade confirmada pela ação da *B. bassiana* foi de 95% e de 62,5%, respectivamente para larvas e adultos, na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹ (Tabela 1, 2 e Figura 5). A mortalidade dos insetos nesta pesquisa foi superior à observada em outros trabalhos, como nos de Batista *et al.* (2003), que encontraram ação larvicida máxima de 17% e adulticida de 29% utilizando *B. bassiana* na concentração de 10^9 conídios.mL⁻¹ sobre *A. diaperinus*. Geden e Steinkraus (2003), encontraram um intervalo de 60 a 90% de mortalidade da fase larval em laboratório, testando *B. bassiana* sobre *A. diaperinus*, fato este que pode ser devido ao isolado (986) ter sido obtido de carrapato. Os isolados de *B. bassiana* podem apresentar especificidade (GEDEN *et al.*, 1998). Isto pode ser evidenciado com isolados de *B. bassiana* obtidos de larvas de cascudinho em infecção natural (WV) e isolado de moscas de casa (NC), obtendo maior sensibilidade do inseto ao isolado WV na concentração $2,5 \times 10^{11}$ conídios m⁻², sendo a eficácia de 100% para larvas, como relatado por Alves *at al.* (2005) e pode estar relacionada à variabilidade genética dos isolados (CASTRILLO *et al.*, 1999).



Figura 5. A) Adulto de *Alphitobius diaperinus* infectado por *Beauveria bassiana*. B) Larva de *Alphitobius diaperinus* infectada por *Beauveria bassiana* e C) Larva de *Alphitobius diaperinus* infectada por *Cladosporium* sp.

No presente estudo o *Cladosporium* sp. não causou mortalidade confirmada significativa, atingindo somente 2,5% das larvas e nenhuma mortalidade confirmada nos adultos, embora o *Cladosporium* sp. seja um fungo entomopatogênico de ocorrência natural, usado amplamente no controle biológico de diversas espécies de insetos fítics e largamente disseminado no ar e matéria orgânica (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Garcia (2004), testando o *Cladosporium cladosporioides* em *Orthezia praelonga*, praga de citrus, encontrou mortalidade de 1,25%, sugerindo que o isolado utilizado pelo autor apresentava baixa virulência, em contraste com Gallo *et al.* (1978), que o observaram em associação com alguns insetos-praga. De acordo com Moraes *et al.* (2001), o *Cladosporium* já foi observado infectando a mosca branca (*Aleurothrixus aepim*) em mandioca no Estado da Bahia, com patogenicidade de até 82% em infecção artificial. Petch (1932), observou este mesmo fungo afetando populações de

afídeos. Também foi constatado ataque natural em ácaros (*Calacarus*) em seringais das regiões de Araçatuba e São José do Rio Preto, SP, (BATISTA FILHO *et al.*, 1991) e em associação com o pulgão vermelho do tabaco (*Myzus nicotianae*) nos Estados do Paraná e Santa Catarina, (SUDO *et al.*, 1995).

Para o *Trichoderma* sp. houve mortalidade confirmada em apenas 7,5% das larvas e nenhuma em adultos. Entretanto, Moraes *et al.* (2001), utilizando *Trichoderma* em diversas cepas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Aedes fluviatilis*, *Aedes aegypti* e *Anopheles aquasalis*, obteve mortalidade confirmada de cerca de 70%. Tanzini (2002), encontrou uma mortalidade confirmada de 78% de ninfas de quarto instar de *Leptopharsa haveae*, precevejo-de-renda-da-seringueira após quatro dias de exposição a uma solução de *Trichoderma*, mostrando que o fungo é um promissor agente de biocontrole.

No presente estudo, observou-se ainda que o estágio larval foi mais suscetível quando comparado ao estágio adulto. Esta observação pode estar relacionada a diferenças no exoesqueleto entre os dois estágios de desenvolvimento. O fato dos adultos apresentarem o tegumento mais esclerotizado do que as larvas pode dificultar a penetração do patógeno. Os fungos infectam os insetos, preferencialmente, pela superfície do tegumento (Boucias e Pendland, 1998). Outros fatores, no entanto, devem ser considerados, como a variabilidade genética entre diferentes gêneros e/ou espécies de fungos, resistência natural por parte de alguns insetos (adultos, principalmente), instabilidade na viabilidade dos conídios ou até mesmo a reduzida virulência.

4.2 Teste de Virulência

Analisando-se a distribuição de mortalidade de larvas de *A. diaperinus* pelo isolado de *B. bassiana*, foi possível verificar que, de modo geral, as larvas experimentarem expressiva mortalidade já no terceiro dia após exposição fúngica, atingindo 62% e 72%, para as concentrações de 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹, respectivamente. A partir do quarto dia de exposição não foi possível verificar diferença significativa entre os tratamentos mostrando que a concentração mais baixa, já apresentava resultados satisfatórios (Tabela 3).

Ainda de acordo com a Tabela 3 observa-se que a concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹ o pico de mortalidade ocorreu no quinto dia, atingindo 100% de mortalidade das larvas, enquanto as concentrações 10^7 conídios.mL⁻¹ e 10^8 conídios.mL⁻¹ atingiram 94 e 98% de mortalidade, respectivamente, com tendência de se estabilizar a partir do sexto dia. Essa diferença na mortalidade entre a concentração mais baixa e as mais altas pode ser consequência do número de conídios que efetivamente, entraram em contato com o inseto.

Este resultado mostra que, dependendo do isolado, uma concentração relativamente baixa já alcança o objetivo de controle das larvas, não sendo necessária uma grande produção de “massa fúngica”.

Tabela 3. Mortalidade (%) *in vitro* de larvas de *Alphitobius diaperinus* tratadas com *Beauveria bassiana*.

Tempo (dia)	Concentração de <i>Beauveria bassiana</i> (conídios/ml)			
	0	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
1	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
2	0,0 ^a	2,00 ^a	8,00 ^a	0,0 ^a
3	0,0 ^a	16,00 ^a	62,00 ^b	72,00 ^b
4	0,0 ^a	96,00 ^b	92,00 ^b	96,00 ^b
5	0,0 ^a	100,00 ^b	94,00 ^b	96,00 ^b
6	0,0 ^a	-	94,00 ^b	96,00 ^b
7	0,0 ^a	-	94,00 ^b	96,00 ^b
8	0,0 ^a	-	94,00 ^b	96,00 ^b
9	0,0 ^a	-	94,00 ^b	96,00 ^b
10	0,0 ^a	-	94,00 ^b	96,00 ^b

^a Médias seguidas de mesma letra em uma mesma linha, não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis

Analisando-se a distribuição de mortalidade de adultos de *A. diaperinus* pelo isolado de *B. bassiana* é possível verificar que a concentração de 10⁶ conídios.mL⁻¹, não foi suficiente para causar mortalidade significativa em nenhum momento do período experimental (Tabela 4). Os adultos foram sensíveis significativamente a *B. bassiana* a partir do quinto dia na concentração de 10⁸ conídios.mL⁻¹. Já no sétimo dia pode ser observada uma mortalidade de

36% na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹, enquanto na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, a mortalidade alcançada foi de 76% não diferindo estatisticamente entre as duas concentrações. O pico de mortalidade ocorreu no 9º dia para a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ e no 10º dia para a concentração 10^7 conídios.mL⁻¹ com 84% e 54%, de mortalidade confirmada, respectivamente.

Tabela 4. Mortalidade (%) *in vitro* de *Alphitobius diaperinus* adultos tratados com *Beauveria bassiana*.

Tempo (dia)	Concentração de <i>Beauveria bassiana</i> (conídios/ml)			
	0	10^6	10^7	10^8
1	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
2	0,0 ^a	0,0 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
3	0,0 ^a	0,0 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
4	0,0 ^a	0,0 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
5	0,0 ^a	0,0 ^a	2,00 ^a	28,00 ^{ab}
6	0,0 ^a	0,0 ^a	12,00 ^{ab}	52,00 ^b
7	0,0 ^a	2,00 ^a	36,00 ^b	76,00 ^b
8	0,0 ^a	6,00 ^a	48,00 ^b	82,00 ^b
9	0,0 ^a	8,00 ^a	52,00 ^b	84,00 ^b
10	0,0 ^a	8,00 ^a	54,00 ^b	84,00 ^b

^a Médias seguidas de mesma letra em uma mesma linha, não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis.

Observou-se que o estágio larval foi mais suscetível quando comparado ao estágio adulto. Isso procede, pois, o mecanismo de infecção realizado em adultos necessita de maior tempo hábil para se concretizar, quando comparado às larvas, devido à espessura da cutícula destas, já que segundo Alves (1998), o tempo necessário para tal mecanismo em insetos pode variar de 72 a 120 horas. Os fungos infectam os insetos, preferencialmente, pela superfície do

tegumento, que nos adultos apresenta-se mais esclerotizado do que em larvas, dificultando a penetração do patógeno (BOUCIAS e PENDLAND, 1998).

No Brasil, estudos com larvas e adultos de *A. diaperinus* submetidos a infecção por *B. bassiana* e *Beauveria* spp., demonstraram que há grande variação na virulência, com valores de mortalidade entre 11 e 100% para larvas e 0 a 95% para adultos (ALEXANDRE *et al.*, 2006). Rohde *et al.* (2006), estudando as concentrações 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ de *B. bassiana*, no 10º dia após inoculação, encontraram maior mortalidade em larvas, quando comparadas a adultos sendo que, na concentração mais elevada, houve 100% de mortalidade, mostrando que o isolado utilizado no presente estudo apresenta-se mais virulento, pois com menor concentração alcançou 100% de mortalidade das larvas. Steenberg e Jespersen (1996), também demonstraram que larvas de *A. diaperinus* são distintamente mais suscetíveis do que adultos, quando em contato com muitas espécies de *B. bassiana*. Relatos mostram que os adultos foram aproximadamente 1000 vezes menos suscetíveis ao fungo *B. bassiana* que larvas jovens (GEDEN, 1998).

Diferentemente do resultado encontrado no presente estudo, as concentrações $3,4 \times 10^6$ e 10^8 conídios.mL⁻¹ de *Beauveria* sp. não tiveram efeitos sobre o inseto adulto em trabalho de Silva (2006), enquanto Batista *et al.* (2003), ao avaliarem a ação de *B. bassiana* na concentração 10^9 conídios. mL⁻¹ em larvas e adultos de *A. diaperinus*, observaram ação larvicida de 17% e adulticida de 29%. A baixa eficácia do fungo verificada nos testes laboratoriais com cascudinho por Silva (2006), pode estar relacionada ao tempo de contato do fungo com o coleóptero.

Nas observações deste estudo, foi possível detectar os principais sintomas de infecção causados pelo fungo *B. bassiana* nos adultos de *A. diaperinus*. Entre os sintomas, se observou a diminuição na movimentação dos insetos infectados, em comparação aos insetos sadios. No dia antecedente à morte, os insetos apresentaram-se em decúbito dorsal e as pernas afastadas do corpo, com movimentos lentos quando tocados. Ao morrerem, apresentaram aspecto rígido e seco, pernas afastadas do corpo e o tegumento com coloração mais clara, quando comparados a insetos saudáveis. A exteriorização do patógeno sobre o corpo do inseto iniciou-se pelas aberturas naturais, dois dias após o acondicionamento em câmara úmida, e entre o 4º e 5º dias, o corpo do inseto estava recoberto, quase que totalmente, pelo fungo.

O valor da concentração letal (CL₅₀) de *B. bassiana* para larvas de *Alphitobius diaperinus* foi $1,02 \times 10^9$ ($2,12 \times 10^4 - 1,23 \times 10^{13}$) observados no 3º dia, e para adultos a CL₅₀ foi de $2,43 \times 10^9$ ($4,25 \times 10^{11} - 3,46 \times 10^{24}$), observada no 7º dia. Estes valores mostram

que o isolado 12 de *B. bassiana* apresenta uma maior virulência para larvas do que para adultos.

4 CONCLUSÕES

Embora concentrações relativamente baixas do isolado de *Beauveria bassiana* tenham produzido mortalidade em larvas de *Alphitobius diaperinus*, a necessidade de maior concentração para eficácia em adultos, observadas no presente estudo, deve ser considerada

em estudos para possíveis aplicações futuras, tendo em vista a heterogeneidade de estágios de *Alphitobius diaperinus* em uma granja avícola.

Os resultados indicam ser a *B. bassiana* um fungo promissor no controle da praga, entretanto, são necessários ainda mais estudos para definir de forma precisa a aplicação deste agente de controle no manejo do cascudinho, levando sempre em consideração a relação custo-benefício e as condições do ambiente de uma granja avícola.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Efeito da temperatura e substrato sobre *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e sua relação no

controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 75-82, 2006.

ALVES, L.F.A.; GASSEN, M.H.; PINTO, F.G.S.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviário comercial de Cascavel, PR. *Neotropical Entomology*, v. 34, p. 507-510, 2005.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Fealq, p. 289-381, 1998.

ALVES, S.B.; MORAES. Quantificação de inóculo de patógenos de inseto.. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2^a ed., FEALQ, Piracicaba, p. 765- 777, 1998

APUYA, L.C.; STRINGRAM, S.M.; AREDENS, J.J.; BROOCKS, W.M. Prevalence of protozoan infections in darkling beetles from poultry houses in North Carolina. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 63, p. 255-259, 1994.

BATISTA FILHO. A.; LEITE, L.G.; FURTADO, E.L.; SILVEIRA, A.P.; ORTOLANI, A.A.; ALVES, L.F.A.; LEITÃO, A.E.F. Ocorrência natural de *Cladosporium* sp. atacando *Calacarus* sp., em cultura de seringueira. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 4, 1991, Campinas. *Resumos...* Campinas, p. 21-22, 1991.

BATISTA, J.S.S. Influência do meio de cultivo na virulência de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. In: SEMANA DE BIOLOGIA, UNIOESTE – CAMPUS, 18. 2003, Cascavel, PR. *Anais...* Cascavel: Unioeste, 2003.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Principles of insects pathology. Boston: *Kluwer Academic Publishers*, p. 259-283, 1998.

CASTRILLO, L.A.; WIEGMANN, B.M.; BROOKS, W.M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 73, p. 269-275, 1999.

CRAWFORD, P.J.; BROOKS, W.M.; ARENDS, J.J. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 91, p. 1295-1301, 1998.

DE LAS CASAS, E.; HAREIN, P.K.; POMEROY, B.S. Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. *Environmental Entomology*, v. 1, n. 1, p. 27-30, 1972.

DE LAS CASAS, E.; HAREIN, P.K.D.; ESHMUCK, D.R.; POMEROY. B.S. The relationship between the lesser mealworm and avian viruses. I. Reovirus 24. *Environmental Entomology*, v. 2, p. 1043-1047, 1973.

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

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

EIDSON, C.S.; SCHMITTLE, S.C.; GOODE, R.B.; LAL, J.B. Induction of leukosis tumors with the beetle *Alphitobius Diaperinus*. *American Journal Veterinary Research*, v. 27, n. 119, p. 1053-7, 1966.

- ELOWNI, E.E.; ELBIHARIS, S. Natural and experimental infection of the beetle *Alphitobius diaperinus* with choanotaenia infundibulum and other chicken tapeworms. *Veterinary Science Communications*, v. 3, p. 171-173, 1979.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo: *Agronômica Ceres*, p. 649, 1978.
- GARCIA, M.O. *Utilização de fungos entomopatoginicos para controle de orthazia praelonga (sternorryncha: Ortheziidae)*. [Dissertação]. Piracicaba (SP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo; 2004.
- GEDEN, C.J.; ARENDS, J.J.; RUTTZ, D.A.; STEINKRAUS, D.C. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in poultry litter, soil and a pupal trap. *Biological Control*, p. 13:71-77, 1998.
- GEDEN, C.J.; STEINKRAUS, D.C. Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* for control of lesser mealworm and hide beetle in Georgia poultry houses. *Journal of Economic Entomology*, v. 96, p. 1602-1607, 2003.
- LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: formicidae). *Revista Árvore*, v. 29, p. 553-561, 2005.
- MATIAS, R.S. Controle *Alphitobius diaperinus* em piso de cama de aviários. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 205-207, 1992.
- MCALLISTER, J.C.; STEELMAN, C.D.; NEWBERRY, L.A.; SKEELES, J.K. Isolation of Bursal Disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) *Poultry Science*, v. 74, p. 45-9, 1995.
- MORAES, A.M.L.; BORBA, C.M.; COSTA, G.L.; RODRIGUES, K.; SARQUIS, M.I.M. FUNGOS: Ferramentas na saúde pública. *Revista Pesquisa. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, p. 10-11, 2001.
- OLIVEIRA, J.S.; SOUZA, S.E.; OLIVEIRA, L.L.; CARVALHO, J.S.; MOREIRA, D.M.O. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões de produtores de café da Bahia. *Bahia Agrícola*, v. 6, n. 3, p. 72-75, 2004.
- PAIVA, D.P. Controle de moscas e cascudinhos. Desafios na produção agrícola. In: simpósio sobre resíduos da produção avícola, 2000, Concórdia, SC. *Anais... Concórdia: Embrapa de Suínos e Aves*, 2000.
- PETCH, T. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 19, p. 55-75, 1935.
- REYNA, P.S.; MCDADDOUGALD, L.R.; MATHIS, G.F. Survival of cocida in poultry litter and reservoirs of infection. *Avian Disease*, v. 27, p. 464-473, 1983.
- ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; SILVA, E.R.L.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 231-240, 2006.
- SILVA, A.S.; QUILTAL, A.P.N.; MONTEIRO, S.G.; DOYLE, R.L.; SANTURIO, J.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo

- biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1944-1947, 2006.
- STEELMAN, D. Darkling beetles are costly pests. *Poultry Digest*, v.55, p. 22-23, 1996.
- STEENBERG, T.; JESPERSEN, J.B. Entomopathogenic fungi for control of litter beetles. *Danish Pest Infestation Laboratory Annual Report*, v. 65, p. 72-73, 1996.
- SUDO, S.; MELO, A.B.P.; GALINA, E. Biological control of Tabaco Aphids. *Presented at the CORESTA Agro-Phyto Meeting*, Oxford: CORESTA, p. 6, 1995.
- TANZINI, M.R. *Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira Leptopharsa heveae com fungos entomopatogênicos*. [Tese]. Piracicaba (SP). Escola Superior de Agricultura. Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo; 2002.
- TSENG, Y.L.; DAVIDSON, J.A.; MENZER, R.E. Morphology and chemistry of the odoriferous gland of the lesser mealworm, *A. diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Annals Entomology of Society American*, v. 64, p. 425-430, 1971.
- TURNER, E.C. Structural and litter pests. *Poultry Science*, v. 65, p. 425-430, 1986.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG – *Sistema de análises estatísticas e genéticas*. Viçosa: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 2007. Manual do usuário, 150p. (versão 9.1).

CAPÍTULO II

**RESPOSTAS DE FRANGOS DE CORTE Á INOCULAÇÃO DE *BEAUVERIA*
*BASSIANA***

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a inocuidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o desempenho de frangos de corte por meio de índices de produtividade, análises hematológicas e histopatológicas. Foram utilizados 240 frangos de

corte da linhagem comercial Cobb alojados em baterias metálicas com vinte e quatro compartimentos de 0,90 x 0,85 x 0,40 metros. A distribuição das aves foi inteiramente casualizada e os tratamentos distribuídos em um delineamento experimental em blocos ao acaso, contando com quatro tratamentos e seis repetições, onde foram aplicados os seguintes programas: T1 – controle (solução salina + tween); T2 – suspensão com 10^6 conídios.mL⁻¹; T3 – suspensão com 10^7 conídios.mL⁻¹; T4 – suspensão com 10^8 conídios.mL⁻¹. A inoculação ocorreu no 14° e 28° dia de vida das aves e para cada tratamento foi utilizado 0,5 mL para inoculação oral e uma gota para inoculação nasal. Os resultados foram analisados com base na análise de variância, e as médias comparadas por teste de Newman-Keuls, a 5 % de probabilidade. Não houve diferenças estatísticas no ganho de peso e no consumo de ração entre os tratamentos, embora na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ tenha ocorrido menor ganho de peso em relação a concentração 10^6 conídios.mL⁻¹. Nesta concentração a conversão alimentar foi estatisticamente igual ao controle, com resultados piores que os demais tratamentos. Não houve diferença estatística para viabilidade. Os resultados quanto ao rendimento de carcaça, pesos absolutos e relativos do coração e fígado, não foram influenciados significativamente ($p>0,05$) pelas concentrações de fungos. No hemograma foi observado aumento significativo do número de leucócitos totais (leucocitose) para o grupo que recebeu a maior concentração de fungo. Em relação ao leucograma, pode-se observar diferença estatística com aumento significativo do número de leucócitos totais, linfócitos, heterófilos e monócitos, para a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹. Os resultados histopatológicos não revelaram presença de lesões aparentes no pulmão e na bursa de Fabrícus, em nenhuma das concentrações de fungos testadas. Todavia, a análise histopatológica do fígado revelou necrose de coagulação focal e infiltrado leucocitário constituído por heterófilos e células mononucleadas, principalmente em torno dos ductos biliares, os quais não apresentaram lesões aparentes e arranjo celular dentro dos padrões de normalidade. Estas lesões foram moderadas no tratamento com a concentração 10^7 e mais acentuadas no tratamento com a concentração 10^8 . Embora não tenha ocorrido alteração substancial, as pequenas alterações histopatológicas e hematológicas podem ter sido decorrentes do severo desafio a que foram submetidos. Indicando uma possível relação dose-efeito do produto biológico.

Palavras-chave: Frango de corte. *Beauveria bassiana*. Índices de produtividade. Hematologia. Histopatologia.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on broilers performance through productivity rates and hematological and histopathological analysis. Two-hundred and forty chickens from Cobb commercial line were housed in metal batteries with twenty-four compartments of 0.90 x 0.85 x 0.40 meters. The

distribution of birds was completely random and treatments distributed in an experimental design in randomized blocks, with four treatments and six replications,: T1 - control (saline + tween), T2 - suspension with 10^6 conídios.mL⁻¹, T3 - suspension with 10^7 conídios.mL⁻¹, T4 - suspension with 10^8 conídios.mL⁻¹. The inoculation was performed on the 14th and 28th of age and each treatment used 0.5 mL for oral inoculation and a drop for nasal inoculation. The results were analyzed based on the analysis of variance, and the averages compared by Newman-Keuls test, with 5% significance. There were no statistical differences in weight gain and feed intake between treatments, although in the 10^8 conídios.mL⁻¹ concentration occurred a lower weight gain compared to 10^6 conídios.mL⁻¹ concentration. At this concentration, the feed conversion was equal to control, with lower results than the other treatments. There was no statistical difference for viability. Regarding weight gain, the absolute and relative heart and liver weights were not significantly ($p > 0.05$) affected by concentrations of fungi. The blood evaluation showed significant increase in the total number of leukocytes (leukocyteses) in the group that received the highest concentration of fungus. Compared to white blood cell, there was statistical difference with increase in the total number of leukocytes, lymphocytes, monocytes and heterophils at the concentration 10^8 conídios.mL⁻¹. The histopathological analysis revealed no apparent lesions in the lungs and Fabricius bursa, at any concentrations of fungi tested. However, the histopathological analysis revealed liver necrosis with focal coagulation and infiltrated leukocyte presenting heterophils and mononuclear cells, mainly around the bile duct, which showed no apparent injuries and cellular arrangement within the normal range. These lesions were moderate at concentration 10^7 and more pronounced at 10^8 . Although no substantial change has occurred, the small hematological and histopathological changes may have caused the severe challenge they have suffered, indicating a possible dose-effect relationship of organic product.

Key words: Broilers. *Beauveria bassiana*. Scores of productivity. Hematology. Histopathology.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem evoluindo nos últimos anos, com técnicas de criação que proporcionam um abate das aves em menos tempo, com maior peso e menor custo. O nível tecnológico alcançado pela avicultura industrial nacional colocou a atividade em posição privilegiada em relação a outras no cenário da pecuária brasileira, com uma produtividade que

vem permitindo ao país se manter como um dos maiores produtores e maior exportador mundial de carne de frango no ano de 2008. Com o crescimento da avicultura, houve necessidade de aumento da produção em menor tempo e espaço. Para isso, tecnologias foram empregadas como melhoramento genético, emprego de vacinas, antibióticos, probióticos, inseticidas e programas de qualidade total. Deste modo, planos de biossegurança incluindo a implantação de medidas preventivas a diferentes patógenos, passou a ser uma exigência, pois a ocorrência de qualquer obstáculo, em alguma fase do segmento, pode refletir em queda de produtividade e conseqüente prejuízo.

Nos sistemas atuais de criação de frangos de corte, as práticas de manejo aliadas às formas de confinamento favorecem a ocorrência de uma das espécies que melhor se adaptou aos aviários: o *Alphitobius diaperinus*, Panzer 1797, conhecido popularmente como cascudinho (PAIVA, 2000), tornando-se praga de grande importância em aviários industriais.

O controle biológico pode viabilizar uma alternativa, principalmente pela segurança às aves, pois fungos entomopatogênicos são considerados seguros tanto para o homem como para o ambiente, não oferecendo risco aos animais homeotérmicos (PEREIRA e ALVES 1998). Além disso, a permanência desses organismos no ambiente é potencialmente maior do que a dos produtos químicos (CRAWFORD *et al.* 1998). *Beauveria bassiana* é encontrada comumente infectando insetos (ALVES, 1986), e seu uso como entomopatogênico tem uma grande vantagem sobre os pesticidas convencionais, pois persiste na população hospedeira, reduz sua longevidade e ocasiona altas taxas de mortalidade em larvas e adultos das populações de insetos (ROBERTS e CASTILLO, 1980).

Algumas espécies de fungos entomopatogênicos já foram estudadas em relação a sua segurança aos animais (HARTMANN e WASTI, 1976; HARTMANN *et al.*, 1979; WASTI *et al.*, 1980). Na literatura consultada não foram encontrados relatos da ação de *B. bassiana* sobre aves. Frente ao exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a inocuidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o desempenho, hematologia e histopatologia de frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização e Período Experimental

O experimento foi conduzido no Departamento de Nutrição Animal e Pastagens (DNAP) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ,

no município de Seropédica/ RJ. O período experimental foi de 28 de abril a 06 de junho de 2008.

2.2 Instalações, Equipamentos e Distribuições das Aves

Foram alojados inicialmente 269 pintos de corte machos de um dia de idade, da linhagem comercial Cobb, os quais foram mantidos em círculo de proteção com campânula à gás, provido de bebedouros infantis do tipo copo (2,5L cada) e comedouros tipo bandeja até o 7º dia de idade (Figura 1A e B). Os pintos foram vacinados contra as doenças de Marek e Gumboro no incubatório.



Figura 1. A) Círculo de proteção com campânula à gás. B) Bebedouros infantis do tipo copo (2,5L cada) e comedouros tipo bandeja.

A partir do 7º dia os pintos foram transferidos para quatro baterias metálicas com três andares, e seis compartimentos de 0,90 x 0,85 x 0,40m em cada uma (Figura 2A) totalizando 24 parcelas experimentais. Todas as aves foram pesadas, para que a distribuição nas unidades experimentais obedecesse à uniformidade de peso vivo em cada repetição média de (1548g), perfazendo um total de 10 animais por unidade experimental totalizando 240 frangos. Cada compartimento foi provido de um bebedouro infantil do tipo copo (2,5L) e um comedouro tipo bandeja (Figura 2B).

Aos dez dias de idade os comedouros e bebedouros infantis foram substituídos por um comedouro e dois bebedouros tipo calha que ficavam na parte externa das unidades experimentais, cujo comprimento equivalia as dimensões do compartimento que tinham em média 10 cm de largura.



Figura 2. A) Baterias metálicas. B) Pesagem das aves ao 7 dias e C) Bebedouro e comedouro tipo calha.

O aquecimento das aves foi fornecido por lâmpadas de 100 Watts até os 12 dias de idade em cada unidade experimental. Durante o período de criação (1 – 38 dias) as aves receberam 24 horas de iluminação (natural + artificial). O peso dos animais foi registrado no 7º, 21º, 33º e 38º dias de idade, e o consumo de ração foi registrado nos 7º, 14º, 21º, 28º, 33º, 38º dias. Utilizaram-se rações formuladas para atender o mínimo das recomendações preconizadas por Rostagno *et al.* (2005), assim discriminadas: pré-inicial do 1º ao 7º dia, inicial do 8º ao 21º dia, crescimento do 22º ao 33º dia e pré - abate do 34º ao 42º dia.

As aves foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, e os tratamentos distribuídos em delineamento experimental em blocos ao acaso contando com quatro tratamentos e seis repetições, onde foram impostos os seguintes programas: T1 – controle (solução salina + tween); T2 – suspensão 10^6 conídios.mL⁻¹; T3 – suspensão 10^7 conídios.mL⁻¹; T4 – suspensão 10^8 conídios.mL⁻¹. Todas as aves receberam ração e água a vontade, durante todo o período experimental.

2.3 Preparação e Inoculação da Suspensão de Fungos

Foi utilizado o isolado 12 de *Beauveria bassiana* proveniente da coleção da PESAGRO -RIO – EES (Estação Experimental de Seropédica, RJ). As suspensões foram preparadas no Laboratório de Micologia do Projeto Sanidade Animal (PSA) UFRRJ / EMBRAPA situado no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

A cultura fúngica foi obtida a partir dos cascudinhos mortos em um teste de patogenicidade preliminar e que apresentaram exteriorização do fungo. A multiplicação ocorreu em tubos contendo meio de cultura BDA (ALVES *et al.*, 1998), incubadas em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), por um período de sete a dez dias para crescimento vegetativo e conidiogênese. Após este período, os conídios foram coletados, raspando-se o meio de cultura e o fungo foi homogeneizado em Erlenmayer de 250ml contendo solução salina 0,85 % de NaCl + 0,1% de Tween 80. A quantificação dos conídios foi realizada em microscópio óptico utilizando o terceiro campo da câmara de Neubauer, que compreendiam uma área de $0,0400 \text{ mm}^2$. O número médio de conídios contados em 5 destes campos (n) foi multiplicado pelo fator fixo desse campo ($n \times 2,5 \times 10^5$), calculado em função do seu volume, o que determinou o número de conídios existentes na suspensão (ALVES e MORAES, 1998). Foram preparadas suspensões de conídios nas concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 conídios.mL⁻¹.

A inoculação ocorreu no 14° e 28° dia de vida das aves e para cada tratamento foi utilizado 0,5 mL para a inoculação oral e uma gota para a inoculação nasal (Figura 3). O tratamento controle recebeu somente a solução salina 0,85 % de NaCl + 0,1% Tween 80.



Figura 3. A) Inoculação da suspensão de *Beauveria bassiana* via nasal. B) Inoculação da suspensão de *Beauveria bassiana* via oral.

2.4 Análise Microbiológica da Cloaca

No dia seguinte à primeira inoculação da suspensão, foram coletados materiais, por Swab, na região da cloaca de duas aves por unidade experimental, sendo doze aves por tratamento, totalizando 48 aves. Os Swabs foram levados ao Laboratório de Micologia do Projeto Sanidade Animal (PSA) UFRRJ / EMBRAPA dentro de tubos de vidro esterilizados (Figura 3 A).

No laboratório, através de esfregão, as amostras foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA, e incubadas em câmara BOD ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14h de fotofase) por 10 dias para permitir o desenvolvimento dos microorganismos (Figura 4).



Figura 4. A) Swab da cloaca da ave. B) Tubo de ensaio com o Swab e C) Inoculação do Swab no meio de cultura.

2.5 Avaliação do Desempenho Produtivo

Para verificação do desempenho zootécnico foram avaliados os seguintes parâmetros: ganho de peso, obtidos pela diferença entre o peso inicial e final de cada período; consumo de ração calculado considerando-se a ração fornecida e as sobras de rações nos comedouros para cada período; conversão alimentar, obtida pela divisão do consumo de ração pelo peso das

aves para cada período e peso vivo obtido pelo peso médio dos frangos antes do jejum pré-abate, aos 38 dias de idade. A viabilidade foi determinada em percentual, a partir do número de frangos vivos em cada repetição, no último dia de cada período experimental.

2.6 Avaliação das Carcaças

Ao final do ensaio de desempenho, aos 38 dias de idade, as aves foram submetidas a jejum de sólidos por oito horas. Para avaliação das características de carcaças, foram retiradas duas aves por unidade experimental com peso médio do grupo, sendo 12 aves por tratamento, totalizando 48 aves. Após o jejum as aves foram individualmente pesadas, identificadas e sacrificadas por deslocamento cervical, no abatedouro do Instituto de Zootecnia da UFRRJ.

Posteriormente foram sangradas, escaldadas a 54°C por 2 minutos, depenadas mecanicamente, evisceradas manualmente e retirada a cabeça. Após serem lavadas as carcaças foram dependuradas pelos pés por 5 minutos para eliminação do excesso de água (Figura 5A) e em seguida foram embaladas em sacos plásticos previamente identificados e pesadas para avaliação do peso da carcaça quente (Figura 5B). Os órgãos (fígado e coração) foram embalados individualmente em sacos plásticos, identificados e resfriados para posteriores pesagens.

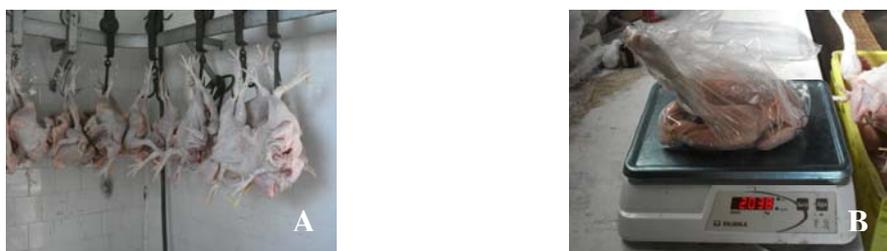


Figura 5. A) Gotejamento das aves. B) Pesagem da carcaça quente.

Para determinação do rendimento de carcaça (%), foi considerado o peso da carcaça quente (depenada, eviscerada e sem cabeça) em relação ao peso vivo após o jejum. Foram ainda avaliados os pesos absolutos (peso total em gramas) do coração e fígado. Os pesos relativos expressos em porcentual foram calculados a partir dos respectivos pesos absolutos em relação ao peso da carcaça quente. A moela foi aberta, o conteúdo removido e feita a análise macroscópica para detecção de lesões.

2.7 Rações Utilizadas no Experimento

Foram utilizados quatro tipos de rações: pré-inicial do 1º ao 7º dia; inicial do 8º ao 21º dia; crescimento do 22º ao 33º dia e pré - abate do 34º ao 38º dia, formuladas para atender, no mínimo, às recomendações preconizadas por Rostagno *et al.* (2005), (Tabela 1). Previamente, foram realizadas análises micotoxicológicas dos componentes das rações (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989), não tendo sido encontradas concentrações detectáveis de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona.

Tabela 1. Composição percentual e química das rações.

<i>Ingredientes (%)</i>	<i>1 a 7</i>	<i>8 a 21</i>	<i>22 a 33</i>	<i>34 a 38</i>
	<i>dias*</i>	<i>dias</i>	<i>dias</i>	<i>dias</i>
Milho (7,9% PB) ¹	57,544	60,766	64,898	68,898
Farelo de soja (45,7%PB)	36,509	33,913	29,677	25,918
Óleo de soja	1,730	1,603	1,871	1,850
Fosfato bicálcico	1,895	1,762	1,604	1,457
Calcário calcítico	0,851	0,818	0,776	0,745
Cloreto de sódio	0,463	0,446	0,421	0,401
DL-metionina	0,351	0,176	0,225	0,213
L-lisina HCL	0,359	0,223	0,225	0,265
L-treonina	-	0,036	0,052	0,063
Cloreto de colina	0,045	0,040	0,040	0,040
Suplemento vitamínico ²	0,100	0,050	0,100	0,100
Suplemento mineral ³	0,100	0,050	0,050	0,050
Promotor de desempenho ⁴	0,010	0,013	0,013	--
Coccidiostático ⁵	0,040	0,036	0,050	--

Total	100	100	100	100
Nutrientes	Composição química calculada			
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,9250	2,9800	3,0500	3,1000
Proteína Bruta (%)	21,9880	20,6500	19,1000	17,7400
Cálcio (%)	0,9310	0,8780	0,8100	0,7510
Fósforo Disponível (%)	0,4660	0,4390	0,4050	0,3740
Fósforo Total (%)	0,7041	0,6719	0,6275	0,5879
Sódio	0,2210	0,2130	0,2010	0,1910
Lisina Digestível (%)	1,3229	1,1222	1,0611	1,0059
Lisina Total (%)	1,4350	1,2270	1,1570	1,0940
Metionina Digestível (%)	0,6558	0,5200	0,5021	0,4744
Metionina Total (%)	0,6833	0,5453	0,5257	0,4964
Metionina+Cistina Digestível (%)	0,9435	0,7997	0,7668	0,7263
Metionina+Cistina Total (%)	1,0190	0,8710	0,8330	0,7880
Treonina (%)	0,8340	0,8340	0,7870	0,7440
Triptofano (%)	0,2776	0,2630	0,2383	0,2167
Ácido linoléico	2,2506	2,2222	2,4114	2,4462

*Período não experimental

Níveis de garantia por kg de produto: 1. Valor determinado no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia da UFRRJ. 2. Suplemento vitamínico inicial: Vitamina A 1.200.000 UI, Vitamina D3 2.200.000, Vitamina E 30.000 mg, Vitamina K3 2.500mg, Vitamina B1 2.200 mg, Vitamina B2 6.000 mg, Vitamina B6 3.300 mg, Vitamina B12 16.000 mcg, Niacina 53.000 mg, Ac. Pantotênico 13.000 mg, Biotina 110mg, Ac. Fólico 1.000 mg, antioxidante 500mg, Suplemento vitamínico final: Vitamina A 1.000.000 UI, Vitamina D3 1.700.000, Vitamina E 20.000 mg, Vitamina K3 2.000mg, Vitamina B1 2.000 mg, Vitamina B2 4.000 mg, Vitamina B6 2.000 mg, Vitamina B12 10.000 mcg, Niacina 20.000 mg, Ac. Pantotênico 10.000 mg, Biotina 25mg, Ac. Fólico 500 mg. 3. Níveis de garantia por kg de produto: Suplemento mineral:

Selênio 250 mg, Manganês 75.000 mg, Zinco 70.000 mg, Ferro 50.000, Cobre 8.500 mg, Iodo 1.500 mg, Cobalto 200 mg. 4. Promotor de desempenho: Colistina 8% 5. Coccidiostático: Semduramicina 5g

2.8 Análises Hematológicas

Amostras de sangue foram coletadas no momento do abate (aves com 38 dias de idade) em tubos com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético de sódio) para a realização das análises hematológicas. Após as coletas, realizadas pela manhã, as amostras contidas nos tubos foram acondicionadas e transportadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram então realizadas as seguintes provas hematológicas: concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT)), determinada por meio do método de refratometria (COLES, 1984); determinação do hematócrito (HT) efetuadas através do método do microhematócrito, segundo metodologia descrita por Jain (1993); contagens de hemácias e leucócitos totais realizadas em hemocítômetro, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (NATT; HERRICK, 1951).

A contagem de leucócitos foi realizada na diluição de 1/100 e a contagem de hemácias na diluição de 1/200. Foram contados os leucócitos do quadrante 1 mm^3 central (25 subdivisões do retículo melhorado da câmara de Neubauer) e; os eritrócitos foram contados neste mesmo quadrante em $1/5$ de mm^3 (cinco subdivisões do retículo melhorado central da câmara de Neubauer). Os respectivos fatores de correção para as contagens totais de leucócitos e de eritrócitos foram o número de células contadas multiplicada por 1.000 e 10.000, respectivamente; considerando-se área, altura da câmara e diluição.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaços sangüíneos corados com hematoxilina-eosina (Panótico Rápido) para determinação dos valores relativos e posteriormente dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos eosinófilos e basófilos.

2.9 Coleta dos Órgãos e Anatomopatologia

Ao final dos abates foram coletadas e conservadas em formol a 10% amostras do fígado, pulmão e bursa de Fabrícus para avaliação histopatológica.

As avaliações macroscópicas foram feitas no momento do abate, quando foram observadas, principalmente alterações no tamanho e coloração dos órgãos, presença de lesões de parênquima e nas mucosas.

2.10 Processamento Histológico

Após a coleta dos fígados, bursa de Fabrícus e pulmão, estes foram fixados em formalina tamponada a 10%, acondicionados em potes de vidro identificados e enviados para o Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ, vinculado ao Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ). Os cortes foram feitos conforme as técnicas histológicas descritas por Luna (1968), medindo aproximadamente 5 μ , corados com hematoxilina e eosina de acordo com Behmer (1976). Os cortes histológicos foram observados ao microscópio óptico binocular marca Carl Zeiss (Republica Federal da Alemanha) e Wild M-20 (Suíça) com auxílio de objetivas de 40X, com a finalidade de visualizar as estruturas morfológicas, grau de lesão e a patologia apresentada.

2.11 Escore de Lesões

Caracterizou-se o grau de lesão conforme a escala demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Escores de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão apresentado.

<i>Grau de Lesão</i>	<i>Escore</i>
Ausência	-
Leve	+
Moderada	+(+)
Acentuada	++

2.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos diferentes grupos, com distribuição normal foram analisados por Análise de Variância, com as médias comparadas por teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas até $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental não foram detectadas alterações clínicas no estado geral das aves, como também não foram observados sinais clínicos de intoxicação em nenhum dos grupos inoculados.

3.1 Análise Microbiológica da Cloaca

Não foi encontrado nenhum vestígio de desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* nas placas de Petri nas quais foram semeados os materiais colhidos na região da cloaca dos frangos. Somente foram detectados microrganismos da flora normal das aves. Diferentemente Wasti *et al.* (1980), obtiveram recuperação dos fungos, em diluições de fezes semeadas em placas ao testarem outros fungos entomopatogênicos (*Metarrhizium anisopliae* e *Paecilomyces fumoso-roseus*) na concentração 10^{10} conídios/ave, onde as suspensões foram diluídas em água de bebida de codornas (*Coturnix coturnix japonica*). Esta diferença entre os resultados pode ser devido às metodologias utilizadas nos experimentos, tanto na concentração de inoculação quanto na coleta de material para análise, uma vez que a concentração de fungo utilizada no experimento com codornas foi mais elevada do que a do presente estudo.

3.2 Avaliação do Desempenho Produtivo

Os resultados de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte aos 38 dias de idade, inoculados com o fungo *B. bassiana* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) de frangos de corte do 1º ao 38º dia de idade, inoculados com *B. bassiana*.

Variáveis	Concentração de <i>B. bassiana</i> (conídios/ml)				Média	CV(%)
	0	10^6	10^7	10^8		
Ganho de peso (g)	2283,91 ab	2326,33 a	2285,93 ab	2232,70 b	2282,22	1,91

Consumo de ração (g)	3307,85 ^a	3416,46 ^a	3437,60 ^a	3368,20 ^a	3382,52	2,68
Conversão alimentar	1,45 ^b	1,47 ^{ab}	1,51 ^a	1,51 ^a	1,48	2,23
Viabilidade (%)	96,70 ^a	96,70 ^a	98,40 ^a	100 ^a	97,92	5,20

^aMédias seguidas de mesma letra em uma mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ($p > 0,05$).

Pela Tabela 3 pode-se observar que não houve diferença estatística no ganho de peso entre o tratamento controle e as concentrações 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios.mL⁻¹ do fungo *Beauveria bassiana*. No entanto na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹ houve menor ganho de peso quando comparado ao tratamento 10^6 conídios.mL⁻¹. Contrariamente Donovan-Peluso *et al.* (1980), não observaram redução no ganho de peso ao testarem os fungos entomopatogênicos *Entomophthora virulenta* e *Entomophthora ignobilis (thaxteriana)* na concentração 10^9 conídios/ave em codorna (*Coturnix coturnix japonica*). Em condições semelhantes, Wasti *et al.* (1980), também observaram redução no ganho de peso tanto do controle quanto dos grupos inoculados com suspensão de 10^{10} dos fungos entomopatogênicos *Metarrhizium anisopliae* e *Paecilomyces fumoso-roseus*.

Embora o consumo de ração não tenha sido afetado, condizendo com os resultados encontrados neste trabalho onde não foram observadas diferenças significativas para consumo de ração entre os tratamentos. Isto pode ter contribuído para os resultados de conversão alimentar, quando, na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, pode ser observado o pior resultado em relação aos tratamentos controle e 10^6 conídios.mL⁻¹, não diferindo estatisticamente da concentração 10^7 conídios.mL⁻¹.

Ainda que considerada uma possível ação deletéria das altas concentrações do fungo *Beauveria bassiana* pelos resultados até aqui apresentados, tal efeito hipotético não foi significativo para interferir na viabilidade, pois não ocorreu nenhum óbito mesmo na maior concentração não tendo sido observada diferença significativa entre os tratamentos.

3.3 Avaliação das Carcaças

Os resultados obtidos para rendimento de carcaça e peso das vísceras dos frangos aos 38 dias de idade estão apresentados na Tabela 4. Os resultados quanto ao rendimento de carcaça, não foram influenciados significativamente ($p>0,05$) pelas concentrações de fungos, tendo sido observado em média 79,55% aos 38 dias de idade o que condiz com um bom rendimento de carcaça quando se inclui pescoço e pés.

Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos e estes não diferiram do tratamento controle para os pesos absolutos e relativos do coração e fígado (Tabela 4), mostrando que o fungo não influencia no desenvolvimento dos órgãos da ave.

Tabela 4. Características de carcaça e desenvolvimento de vísceras de frangos de corte aos 38 dias de idade.

Variáveis	Concentração de <i>B. bassiana</i> (conídios/ml)				Média	CV(%)
	0	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸		
Peso Vivo (g)	2520,66	2593,16	2532,58	2553,16	2549,89	3,36
Rendimento Carcaça (%)	79,00	79,82	79,77	79,56	79,55	1,41
Peso relativo (%)						
Coração	0,62	0,62	0,59	0,63	0,62	10,28
Fígado	1,94	1,93	1,83	1,89	1,90	9,49
Peso absoluto (g)						
Coração	12,16	13,00	12,16	12,03	12,54	10,73
Fígado	37,83	40,16	37,33	38,50	38,45	8,89

3.4 Análise Hematológica

Os valores médios obtidos no hemograma e leucograma nos diferentes grupos experimentais estão demonstrados nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

No hemograma foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração de proteínas plasmáticas totais, hematócrito, hemácias e leucócitos totais. Os valores obtidos para os diferentes parâmetros estão dentro dos valores de normalidade, segundo Jain (1993), com exceção da proteína plasmática em todos os grupos experimentais, ficando abaixo dos valores obtidos pelo mesmo autor, porém os valores encontrados nos grupos teste estão de acordo com os valores observados no grupo controle (controle interno), sugerindo este resultado estar relacionado a fatores extrínsecos. Foi observado também um aumento significativo do número de leucócitos totais (leucocitose) somente para o grupo que recebeu a maior concentração de fungo.

Tabela 5. Médias e desvios padrões dos valores médios do hemograma avaliados em função das diferentes concentrações de *Beauveria bassiana*.

Grupos <i>experimentais</i>	Parâmetros avaliados			
	Proteínas Plasmáticas (g/dL) ¹	Hematócrito (%)	Hemácias (n° células x 10 ⁶ /μL)	Leucócitos (n° células x 10 ³ /μL)
0	3,60 ^a ± 0,22	32,67 ^a ± 2,58	2,55 ^a ± 0,46	23,67 ^a ± 2,94
10 ⁶ con./mL	3,42 ^a ± 0,32	31,67 ^a ± 2,66	2,97 ^a ± 0,23	24,50 ^a ± 4,05
10 ⁷ con./mL	3,33 ^a ± 0,16	33,67 ^a ± 1,96	2,67 ^a ± 0,15	24,17 ^a ± 4,53
10 ⁸ con./mL	3,43 ^a ± 0,36	33,83 ^a ± 2,56	2,56 ^a ± 0,29	38,83 ^b ± 3,54

¹grama/decilitro; ^amédias com letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) e letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$) por análise de variância - Newman-Keuls.

As células do sistema imunológico das aves são constituídas por linfócitos, monócitos, conhecidos como agranulócitos e por heterófilos, eosinófilos, basófilos, conhecidos como granulócitos todos estes tendo importante papel nas respostas imunológicas das aves (MORGULIS, 2002).

Em relação ao leucograma, pode-se observar diferença estatística com aumento significativo do número de leucócitos totais, e na leucometria diferencial observou-se aumento significativo nos valores absolutos de heterófilos, linfócitos e monócitos, em comparação com os outros tratamentos (grupos testes) e o controle que se encontra dentro dos valores de normalidade, com exceção dos heterófilos, que apresentam nos resultados dos grupos teste e controle valores um pouco maiores que os obtidos por Jain (1993). Este aumento deve-se ao fato de geralmente, o leucograma varia muito entre aves normais da mesma espécie, podendo estes valores serem alterados em função de diversos fatores como idade, sexo, estresse, fatores ambientais, entre outros. Como as aves se estressam quando manipuladas, o processo de coleta de sangue pode resultar em uma leucocitose fisiológica, essa resposta aumenta a quantidade de heterófilos, e de linfócitos no sangue periférico.

Normalmente, a faixa de valores de referência para leucócitos totais em aves é mais ampla que a de mamíferos domésticos. Desse modo, os valores do leucograma de aves devem ser muito diferentes da faixa de referência normal para que tenham importância diagnóstica. (THRALL *et al.*, 2006).

Como a leucositose costuma ser causada por inflamação, também se nota heterofilia. A magnitude da heterofilia depende da causa e da gravidade da inflamação. Leucocitose e heterofilia podem estar associadas a inflamação por infecção localizada ou sistêmica causada por vários microrganismos infecciosos (bactéria, fungos, clamídias, vírus e parasitas) ou por enfermidade não infecciosa (traumatismo e intoxicação). Leucocitose e heterofilia acentuadas geralmente se associa a doenças por patógenos aviários comuns, como *Chlamydia*, *Mycobacterium* e *Aspergillus*. Em aves, leucocitose discreta a moderada como a encontrada no presente trabalho, pode ser verificada quando há excesso de glicocorticóides endógenos ou exógenos (leucograma de estresse), no entanto no presente trabalho podemos sugerir que a leucocitose acompanhada de aumento significativo de linfócitos, heterófilos e monócitos, foi ocasionada por uma maior inoculação do fungo (concentração 10^8 conídios. mL⁻¹), sendo características comum observada em infecções fúngicas o aumento desses tipos celulares.

Os monócitos possuem atividade fagocítica, migram aos tecidos, onde se transformam em macrófagos (HARMON e BLISSON, 1993). Eles contem substâncias químicas

biologicamente ativas envolvidas na inflamação e na destruição de microrganismos invasores. Os monócitos também têm importante função imunológica no processamento de antígenos (RAWLEY e RATCLIFFE, 1988).

A monocitose em geral associa-se a doenças infecciosas causadas por microrganismos que promovem, inflamação granulomatosa, como *Mycobacterium*, *Chlamydia* e fungos, como o *Aspergillus*. Há relatos de monocitose em alguns tipos de deficiência nutricional, como na de zinco (WIGHT *et al.*, 1980).

Como não se sabe a função exata dos eosinófilos, é difícil interpretar a eosinofilia periférica em aves. Embora esse granulócito não tenha sido encontrado nas amostras analisadas, eles podem se comportar diferentemente daqueles dos mamíferos. Estudos demonstram que os eosinófilos de aves podem participar de reações de hipersensibilidade retardada (tipo IV), o que não acontece com eosinófilo de mamíferos. (MAXWELL e BURNS, 1986). Experimentos utilizando antígenos parasitários não provocaram eosinofilia periférica, embora haja relato de eosinofilia associada a infestação por nematódeos gastrintestinais (MAXWELL, 1980).

Devido ao pouco conhecimento a respeito da função dos eosinófilos de aves, a eosinofilia periférica nessa espécie pode ser interpretada livremente como sendo uma resposta aos parasitas internos ou externos ou a exposição aos antígenos estranhos (resposta de hipersensibilidade). Pode ser difícil detectar eosinofilia em aves. Caso ocorra, espera-se que esteja associada a uma resposta ao estresse ou ao uso de glicocorticosteróides.

A Basofilia é rara em aves. Como os basófilos de aves produzem, armazenam e liberam histamina, pode ter função semelhante àquela dos basófilos de mamífero (CHAD e EYRE, 1978), portanto basófilos em aves podem participar da reação de hipersensibilidade imediata, liberar inibidores para ativação de trombocitos, provocar contração de músculos liso, induzir a formação de edema e influenciar a coagulação. Eles parecem participar da fase inicial da inflamação aguda em aves, no entanto, isso geralmente não se reflete como basofilia no leucograma (MONTALI, 1988; CARLSON e HACKING, 1972).

Em aves a basofilia periférica pode sugerir inflamação inicial ou reação de hipersensibilidade imediata. Nota-se basofilia relacionada ao estresse em galinhas submetidas à restrição alimentar, mas essa resposta pode depender da idade ou do tempo de restrição (MAXWELL *et al.*, 1990; MAXWELL *et al.*, 1991).

Como eosinófilos e basófilos são encontrados mais facilmente em mamíferos e aves que estão infestados por parasitas ou sofrendo de algum tipo de processo alérgico respectivamente. O número pequeno de animais por grupo no presente experimento, porém,

não deixando de ser significativo, não possibilitou a observação desses tipos celulares na contagem diferencial de leucócitos, uma vez que estes se encontram em número muito pequeno no sangue periférico das aves, corroborando com os valores de normalidade obtidos pelos autores já citados acima.

Wasti *et al.* (1980), ao realizarem contagens diferenciais de células sanguíneas de codorna (*Coturnix coturnix japonica*) inoculadas com suspensão de 10^{10} Conídios/aves dos fungos entomopatogênicos *Metarrhizium anisopliae* e *Paecilomyces fumoso-roseus* não revelaram quaisquer diferenças significativas entre controle e grupos tratados.

Tabela 6. Valores médios e desvios padrões do leucograma avaliados em função das diferentes concentrações de *Beauveria bassiana*.

Fungo (con.mL)	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Contagem diferencial (n.º células $\times 10^3/\mu\text{L}$)		
		Heterófilos	Linfócitos	Monócitos
0	23,67 ^a \pm 2,94	8,260 ^a \pm 1,53	14,123 ^a \pm 2,39	1,287 ^a \pm 0,290
10 ⁶	24,50 ^a \pm 4,09	10,200 ^a \pm 1,97	12,642 ^a \pm 2,77	1,283 ^a \pm 0,270
10 ⁷	24,17 ^a \pm 4,53	10,803 ^a \pm 2,46	11,278 ^a \pm 3,09	2,328 ^a \pm 1,052
10 ⁸	38,83 ^b \pm 3,54	16,803 ^b \pm 4,67	17,810 ^b \pm 5,17	3,725 ^b \pm 0,952

^{a,b} nas colunas: médias com letras iguais não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) e letras diferentes diferem estatisticamente

3.5 Anatomopatologia

Os dados obtidos no exame histopatológico estão apresentados no Quadro 1. Os resultados não revelaram presença de lesões aparentes no pulmão e na bursa de Fabrício, em nenhuma das concentrações de fungos testadas, quando comparado ao grupo controle.

Quadro 1. Grau de lesão nos órgãos em função das diferentes concentrações de *Beauveria bassiana*.

Tipos de Lesões	Concentração de <i>B. bassiana</i> (conídios/ml)											
	0			10 ⁶			10 ⁷			10 ⁸		
	F ²	P	BF	F	P	BF	F	P	BF	F	P	BF
Apoptose	- ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Megalocitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltrado de células mononucleares	-	-	-	-	-	-	+ (+)	-	-	++	-	-
Congestão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrose	-	-	-	-	-	-	+ (+)	-	-	++	-	-
Vacuolização	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Escores de lesão histopatológica referentes ao grau de lesão apresentado. - ausência; + leve; ++ moderada; +++ acentuada; ² F- Fígado; P-Pulmão; BF - Bursa de Fabrício.

Todavia, a análise histopatológica do fígado revelou necrose de coagulação periportal multifocal e infiltrado leucocitário constituído por heterófilos e células mononucleadas, principalmente em torno dos ductos biliares os quais apresentaram-se sem lesões aparentes e arranjo celular dentro dos padrões de normalidade (Figura 6). Estudos testando fungos patogênicos demonstraram que 0,2 mL de *Fusarium* spp. inoculados por via intracerebral e intranasal causou congestão vascular no pulmão e fígado de aves (ADETOSOYE e ADENE, 1978). Entretanto, aves inoculada por via intravenosa com *Cândida albicans* na concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹ não demonstraram sinais de infecção em nenhum órgão (WYATT *et al.*, 1975). Estas lesões foram moderadas no tratamento com a concentração 10^7 conídios.mL⁻¹ e mais acentuadas no tratamento com a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹.

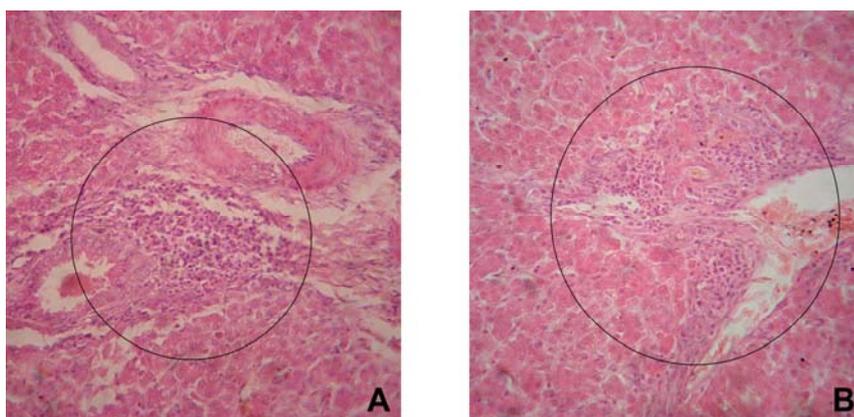


Figura 6. Infiltrado leucocitário em fígado de frango ao 38 dia de idade, inoculados com *Beauveria bassiana*. A) Circulo - lesão moderada. B) Circulo - lesão acentuada. Aumento 40X.

4 CONCLUSÃO

Embora não tenham ocorrido alterações substanciais no desempenho dos frangos, as alterações hematológicas e histopatológicas observadas nas concentrações mais elevadas do fungo objeto deste estudo podem ser decorrentes do desafio a que foram submetidas as aves, indicando uma possível relação dose-efeito do produto biológico.

As alterações histopatológicas observadas nas preparações de amostras de fígado obtidos das aves expostas as concentrações mais elevadas de *B. bassiana* foram compatíveis com um quadro de intoxicação.

Ainda que resultados anteriores indiquem ser a *B. bassiana* um fungo promissor no controle do cascudinho, são necessários mais estudos para definir de forma precisa a incorporação deste agente de controle no manejo daquela praga, levando sempre em consideração a relação custo-benefício, a real virulência do patógeno como agente de controle e as possíveis interações com o ambiente de um criatório de aves.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADETOSOYE, A.I.; ADENE, D. F. The response of chickens to experimental infection with *Fusarium* spp.. *Bulletin of Animal Health and Production Infection in Africa*, v. 26, n. 2, p. 198-00, 1978.
- ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Manole, p. 407, 1986.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, p. 289-381, 1998.
- BEHEMR, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. *Manal de Técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDART, 256p. 1976.
- CARLSON, H. C.; HACKING, M.A. Distribution of mast cells in chicken, turkey, pheasant, and quail and their differentiation from basophils. *Avian Diseases*, v. 16, p.574-577, 1972.
- CHAD, N.; EYRE, P. Immunological release of histamone and SRS in domestic fowl. *Cam J Comp Med*, v. 42, p.519-524, 1978.
- COLES, E. H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3ª edição, Editora Manole, São Paulo, p. 566, 1984.
- CRAWFORD, P.J.; BROOKS, W.M.; ARENDS, J.J. Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) as microbial control agents of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 91, p. 1295-1301, 1998.
- DONOVAN-PELUSO, M.; WASTI, S.S. Safety of entomogenous fungi to vertebrate hosts. *Applied Entomology and Zoology*, v. 15, n. 4, p. 498-99. 1980
- HARMON, B. G.; BLISSON, J.R. Disassociation of bacterial and fungistatic activities from the oxidative burst of avian macrophage. *Am J Vet Res*.v. 51, p. 71-75, 1993
- HARTMANN, G.C.; WASTI, S.S. ; HENDRICKSON, D.L. Murine safety of two appecies of entomogenous fungi, *Cordyceps militaris* (Fies) link and *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) Brown and Smith. *Applied Entomology and Zoology*, v. 14, p. 217-20, 1979.
- HARTMANN, G.C.; WASTI, S.S. Experimental mycosis of the gypsy moth, *Porthetria diaspar* (L.) with the entomogenous fungus, *Canidioholus coronatus* (Cost.)Batko. *Entomophaga*, v. 21, p. 377-82, 1976.
- JAIN, N. C. *Essential of Veterinary Hematology*, Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- LUNA, L. G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 13. ed., New York: McGraw-hill, p. 258, 1968.
- MAXWELL, M. H.; ROBERTSON, G. W.; SPENCE, S.; MCCORQUODALE, C.C. Comparison of haematological values in restricted and ad libitum-fed domestic fowl. II White blood cells and thenbocytes. *Brazilian Journal of Poultry Science* v. 31, p. 399-405, 1990.
- MAXWELL, M. I. L. Attempted induction of an avian eosinophilia using various agents *Research in Veterinary Science*, v. 29, p. 293-297, 1980.

- MAXWELL, M.H.; BURNS, R.B. Experimental stimulation of eosinophil stimulation and of eosinophil production in the domestic fowl. *Research in Veterinary Science*, v. 41, p. 114-123, 1986.
- MAXWELL, M.H.; ROBERTSON, G.W.; ANDERSON, I.A. DICK, L. A. LYNCH, M. Haematology and histology seven-week-old broilers after early food restriction. *Research in Veterinary Science*, v. 50, p. 290-297, 1991.
- MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology*, v. 99, p. 1-26, 1988.
- MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*, Jaboticabal: FUNEP / UNESP, 375 p., 2002.
- NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, v. 31, p. 735-738, 1951.
- PAIVA, D.P. Controle de moscas e cascudinhos. Desafios na produção agrícola. In: simpósio sobre resíduos da produção avícola, 2000, Concórdia, SC. *Anais... Concórdia: Embrapa de Suínos e Aves*, 2000.
- PEREIRA, R.M., S.B. ALVES & P.R. REIS. Segurança no emprego de Entomopatogênicos, p. 171-191. In S.B. 1998.
- RAWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.A. Vertebrate blood cells. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 257-336, 1988.
- ROBERTS, D.W.; CASTILLO, J.M. Bibliography on pathogens of medically important arthropods. *Bulletin World Health Organization*, v. 58, p. 190-197, 1980.
- ROSTAGNO, H. S. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. *Composição de alimentos e exigências nutricionais*. 2ª ed. Viçosa, Minas Gerais – Brasil, p. 186, 2005.
- SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenona and sterigmatocystin in some Brazilian foods by multitoxin thin layer chromatographic method. *Journal of the Association of Analytical Chemists*, v. 72, p. 22-26, 1989.
- THRALL, M.A.; et al. Veterinary hamatology and clinical chemistry. 1ª Ed., Editora ROCA, São Paulo, p.582. 2006
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG – *Sistema de análises estatísticas e genéticas*. Viçosa: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 2007. Manual do usuário, 150 p. (versão 9.1).
- WASTI, S.S.; HARTMANN, G.C.; ROUSSEAU, A. J. Gypsy moyh mycoses by two appecies of entomogenous fungi and an assessment of their avian toxicity. *Parasitology*, v. 80, p. 419-24, 1980.
- WIGTH, P. A. et al. Monocytosis in experimental zinc deficiency of domestic birds. *Avian Pathology*, v. 9, p. 61-66, 1980.
- WYATT, R.D.; SIMMONS, D.G.; HAMILTON, P.B. Induced systemic Candidiasis in young broiler chickens. *Avian Diseases*, v. 19, n. 3, p. 533-43, 1975.

3 CONCLUSÕES GERAIS

O isolado de *Beauveria bassiana* utilizado no presente estudo revelou-se patogênico para larvas de *Alphitobius diaperinus* a partir de concentrações de 10^6 conídios.mL⁻¹. Entretanto a necessidade de maior concentração observada para eficácia em adultos, deve ser considerada em possíveis aplicações futuras, tendo em vista a heterogeneidade de estágios de *Alphitobius diaperinus* em uma granja avícola.

Esses resultados aliados à ausência de efeitos significativos no desempenho dos frangos, inoculados com amostras dos fungos, revelam-se promissores para a continuidade dos estudos sobre o controle biológico daquela praga.

Devem ser consideradas ainda, as alterações hematológicas e histopatológicas, nas concentrações 10^7 conídios.mL⁻¹ e 10^8 conídios.mL⁻¹ que podem ter sido decorrentes do severo desafio a que foram submetidas as aves, indicando uma possível relação dose-efeito do produto biológico.

As alterações histopatológicas observadas nas preparações de amostras de fígado obtidos das aves expostas as concentrações mais elevadas de *B. bassiana* foram compatíveis com um quadro de intoxicação.

Entretanto, são ainda necessários mais estudos para definir de forma mais precisa a aplicação deste agente de controle no manejo do cascudinho, levando sempre em consideração a relação custo-benefício e as condições do ambiente de uma granja avícola.