



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ICF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RODRIGO JOSÉ NUNES CALUMBY

Caracterização da microbiota intestinal cultivável de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) e determinação da atividade celulolítica

Maceió - AL

2021

RODRIGO JOSÉ NUNES CALUMBY

Caracterização da microbiota intestinal cultivável de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) e determinação da atividade celulolítica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: **Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo.**

Co-orientador: **Prof. Dr. Valter Alvino.**

Maceió - AL

2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

C166c Calumby, Rodrigo José Nunes.

Caracterização da microbiota intestinal cultivável de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) e determinação da atividade celulolítica / Rodrigo José Nunes Calumby. – 2021.

112 f. : il. color.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Coorientador: Valter Alvino.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 85-110.

Apêndices: f. 111-112.

1. *Rhynchophorus palmarum* L. 2. *Cocos nucifera*. 3. Microbiota gastrointestinal. 4. Controle biológico de vetores. 5. Celulose. 6. *Thielaviopsis paradoxa*. I. Título.

CDU: 547.458.81:595.768.2

Folha de aprovação

RODRIGO JOSÉ NUNES CALUMBY

Caracterização da microbiota intestinal cultivável de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) e determinação da atividade celulolítica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

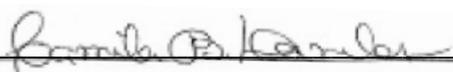


Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo



Co-orientador: Prof. Dr. Valter Alvino

Banca examinadora:



Prof. Drª. Camila Braga Dornelas (Examinador interno)



Prof. Drª. Lara Mendes de Almeida (Examinador externo)

Aprovado em: 15 / 10 / 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Luciano Grillo e Prof. Dr. Valter Alvino pela oportunidade, confiança e por todo conhecimento compartilhado.

À um ser de luz chamado Lara Almeida, pela amizade, incentivo e por toda ajuda concedida.

À Rossana Moreira, pelo carinho, amizade e troca de conhecimentos.

Ao Nicholas, por toda compreensão, carinho e apoio ao longo da elaboração deste trabalho, e na vida.

Ao pessoal da UNIFESP pela ajuda com a identificação dos microrganismos em MALDI-TOF/MS, em especial a amiga Yasmin Nascimento.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), em especial ao Thomás.

Aos companheiros do Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas (LPTF), em especial ao Uriel, Juliana, Dany, Davi e Pedro.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (LCQA), em especial ao querido Cantídio Francisco, sempre tão solícito e atencioso.

Aos familiares que, mesmo distante, sempre me apoiaram. Em especial a minha mãe, minha irmã e minhas tias Bel, Leda e Nilma.

Aos meus avós, Maria de Lourdes e Ernani (*in memoriam*), por não terem medido esforços para minha formação e por serem os meus maiores exemplos de vida, dignidade, ética e amor.

Aos meus filhotes de quatro patas, Luna e Spike.

Aos amigos de longa data: Jéssica, Faustino, Henrique, Gênison, Ruth, Ionara e Thiago.

Aos amigos que a UFAL me presenteou: Rafael, Jorge, Valcilaine, Teresa, Léo, Jéssica, Analu, Mari, Íris, João Victor e Jucenir.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca julgadora, Dr^a. Camila Braga Dornelas e Dr^a. Lara Mendes de Almeida, que aceitaram o convite e se propuseram a contribuir com este trabalho.

Ao final, gostaria de agradecer a uma energia que conspira para o bem e que faz todas as coisas darem certo e os nossos sonhos realizados... muitos a chamam de **Deus**.

"Não importa o que aconteça,

continue a nadar."

(Graham Walters)

RESUMO

Rhynchophorus palmarum L. é uma praga agrícola que afeta diversas culturas, incluindo as plantações de coco (*Cocos nucifera*) que ocupam um lugar de destaque na economia do Nordeste brasileiro. A caracterização da microbiota intestinal de *R. palmarum*, bem como a elucidação de aspectos relacionados à bioquímica e fisiologia da digestão do inseto são essenciais para a intervenção em processos metabólicos específicos como forma de controle da praga. Este estudo teve por objetivo caracterizar a microbiota intestinal cultivável de *R. palmarum* e investigar sua capacidade de degradar substratos celulósicos, visando a exploração de novas formas de controle biológico. Dissecações intestinais de oito insetos adultos (4 machos e 4 fêmeas) de *R. palmarum*, capturados em campo, foram conduzidas em câmara de fluxo laminar. Os intestinos foram inseridos em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubados a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Subsequentemente, diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) dessas culturas foram plaqueadas em meios de cultivo nutritivos para o isolamento de bactérias e fungos. Os microrganismos foram identificados por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF e, posteriormente, avaliados quanto à capacidade de degradação de celulose como fonte de carbono em meio de cultivo sólido contendo carboximetilcelulose. A pesquisa de *Thielaviopsis paradoxa* foi realizada a partir da cultura de amostras da carapaça e do tubo digestivo de *R. palmarum* capturados em campo (n=20) em ágar batata dextrose acrescido de cloranfenicol. Como resultados, 14 gêneros bacterianos atribuídos aos Filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Kerstersia*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Staphylococcus*) e dois gêneros fúngicos (*Candida* e *Saccharomyces*) pertencentes ao Filo Ascomycota foram identificados. As microbiotas intestinais dos insetos machos e fêmeas se mostraram bastante diversificadas com poucas diferenças observadas entre os sexos. Em relação às espécies identificadas, *Enterococcus faecalis* foi mais abundante tanto em insetos machos (25,3%), quanto em fêmeas (47,1%), seguida por *Citrobacter koseri* (15,2%) e *Alcaligenes faecalis* (8,8%) em machos e *Bacillus cereus* (10,4%) e *Citrobacter koseri* (4,4%) em fêmeas. Seis espécies bacterianas (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Citrobacter koseri*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas* sp.) e uma fúngica (*Candida tropicalis*) apresentaram atividade celulolítica, com destaque para *B. cereus* que demonstrou alta síntese de enzima (IE = 4,6). Os isolamentos realizados a partir da carapaça de *R. palmarum* evidenciaram 15,0% de crescimento micelial de *T. paradoxa*, correspondente a três insetos infectados. Não foi encontrado *T. paradoxa* no trato intestinal dos insetos. Este é o primeiro estudo em nível mundial sobre a caracterização da microbiota intestinal de *R. palmarum*, composta principalmente por microrganismos aeróbios facultativos e com metabolismo fermentativo capazes de degradar polissacarídeos de plantas, os quais podem desempenhar um papel importante na nutrição do inseto. Esses achados abrem perspectivas interessantes para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle biológico de *R. palmarum*.

Palavras-chave: *Rhynchophorus palmarum* L.; *Cocos nucifera*; microbiota gastrointestinal; controle biológico de vetores; celulose; *Thielaviopsis paradoxa*.

ABSTRACT

Rhynchophorus palmarum L. is an agricultural pest that affects various palm crops, including coconut (*Cocos nucifera*) plantations which are prominent in the economy of Northeastern Brazil. Characterization of the intestinal microbiota of *R. palmarum*, as well as elucidation of aspects related to the biochemistry and physiology of the insect's digestion are essential for intervention in specific metabolic processes as a form of pest control. This study aimed to characterize the cultivable intestinal microbiota of *R. palmarum* and investigate its ability to degrade cellulosic substrates, in order to explore new biological control measures. Intestinal dissections of eight adult insects (4 males and 4 females) of *R. palmarum* captured in the field was performed in a laminar flow chamber. The intestines were then inserted into brain heart infusion (BHI) broth and incubated at $\pm 35^{\circ}\text{C}$ for 24 hours. Subsequently, serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) of these cultures were plated on nutritious culture media for the isolation of bacteria and fungi. The microorganisms were identified by MALDI-TOF mass spectrometry, and subsequently evaluated for their ability to degrade cellulose as a carbon source in a solid culture medium containing carboxymethylcellulose. The research of *Thielaviopsis paradoxa* was carried out from the culture of *R. palmarum* carapace and digestive tract samples captured in the field ($n = 20$) on potato dextrose agar plus chloramphenicol. As a result, 14 bacterial genera attributed to the Phylum Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Kerstersia*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Staphylococcus*) and two fungal genera (*Candida* e *Saccharomyces*) belonging to the Phylum Ascomycota were identified. The intestinal microbiotas of male and female insects proved to be quite diversified with few differences observed between the sexes. Regarding the species identified, *Enterococcus faecalis* was more abundant both in male insects (25.3%) and in females (47.1%), followed by *Citrobacter koseri* (15.2%) and *Alcaligenes faecalis* (8.8%) in males and *Bacillus cereus* (10.4%) and *Citrobacter koseri* (4.4%) in females. Six bacterial (*Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Citrobacter koseri*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas* sp.) and one fungal (*Candida tropicalis*) species showed cellulolytic activity, with emphasis on *B. cereus*, which showed high enzyme synthesis (IE = 4.6). The isolations made from the carapace of *R. palmarum* showed 15.0% of mycelial growth of *T. paradoxa*, corresponding to three infected insects. *T. paradoxa* was not found in the intestinal tract of insects. This is the first worldwide study on the characterization of the intestinal microbiota of *R. palmarum*, composed mainly of facultative aerobic microorganisms with fermentative metabolism capable of degrading plant polysaccharides, which can play an important role in insect nutrition. These findings open interesting perspectives for the development of new strategies for the biological control of *R. palmarum*.

Keywords: *Rhynchophorus palmarum* L.; *Cocos nucifera*; gastrointestinal microbiota; biological control of vectors; cellulose; *Thielaviopsis paradoxa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Inseto adulto da espécie <i>Rhynchophorus palmarum</i>	18
Figura 2. Dimorfismo sexual nos adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> , evidenciado pelas características do rostró. (a) fêmea; (b) macho.....	18
Figura 3. Larva de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	19
Figura 4. Danos causados pela alimentação de larvas de <i>R. palmarum</i> em coqueiro.....	22
Figura 5. Coqueiro afetado pela doença do anel vermelho.....	23
Figura 6. Plantação afetada pela resinose do coqueiro.....	25
Figura 7. Estrutura geral do intestino de insetos.....	32
Figura 8. Etapas de preparo e dissecação de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> ...	46
Figura 9. Características morfológicas de colônias isoladas do intestino de <i>R. palmarum</i> , crescidas em ágar Mueller Hinton.....	47
Figura 10. Morfologia bacteriana e fúngica por meio de coloração de Gram de alguns isolados representativos do intestino de <i>R. palmarum</i>	48
Figura 11. Fluxograma contendo resumo da metodologia para isolamento e identificação de microrganismos cultiváveis do trato intestinal de <i>R. palmarum</i> ...	50
Figura 12. Ensaio de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão, evidenciando os halos de inibição do crescimento microbiano em cepa controle.....	54
Figura 13. Cultura do exoesqueleto (a) e do tubo digestivo de <i>R. palmarum</i> (b) para isolamento de <i>T. paradoxa</i>	56
Figura 14. Microcultivo em lâmina para observação de características microscópicas das colônias fúngicas.....	57
Figura 15. Número de morfotipos obtidos a partir dos meios de cultura utilizados para o isolamento de microrganismos do trato intestinal de <i>R. palmarum</i>	59
Figura 16. Tipos morfológicos microbianos isolados do trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i>	60
Figura 17. Gêneros bacterianos e fúngicos identificados no trato intestinal de <i>R. palmarum</i> por MALDI-TOF/MS, utilizando-se diferentes meios de cultura.....	61

Figura 18. Distribuição relativa (%) dos filos pertencentes aos microrganismos identificados do trato intestinal de <i>R. palmarum</i>	62
Figura 19. Abundância relativa (%) das famílias de microrganismos cultiváveis associadas ao trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i>	64
Figura 20. Distribuição relativa (%) de espécies identificadas no trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i>	65
Figura 21. Atividade celulolítica de espécies bacterianas e fúngicas isoladas do intestino de insetos adultos de <i>R. palmarum</i>	72
Figura 22. Ensaio de atividade celulolítica em ágar CMC corado com vermelho do Congo.....	74
Figura 23. <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . (a) Aspectos macroscópicos em ágar BDA após 48 horas de incubação; (b) Aspectos microscópicos em lâmina corada com lactofenol azul de algodão, aumento de 400X.....	79
Figura 24. Fungos identificados no exoesqueleto de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> capturados na cidade de Maceió – Al.....	80
Figura 25. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos identificados na carapaça de <i>R. palmarum</i> , cultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose a 28°C. Lâminas coradas com lactofenol azul-algodão.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antimicrobianos utilizados nos ensaios de disco difusão em ágar e suas respectivas concentrações.....	53
Tabela 2. Descrição filogenética dos isolados bacterianos e fúngicos representativos do intestino de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> , conforme identificação realizada em MALDI-TOF/MS.....	63
Tabela 3. Sensibilidade de cocos Gram-positivos isolados do trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> por meio de disco difusão.....	76
Tabela 4. Perfil de suscetibilidade de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados do trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> por meio de microdiluição em caldo (n=52).....	76
Tabela 5. Sensibilidade de bacilos Gram-negativos isolados do trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> por disco difusão.....	77
Tabela 6. Perfil de suscetibilidade antifúngica de leveduras isoladas do trato intestinal de insetos adultos de <i>R. palmarum</i>	77
Tabela 7. Número de insetos adultos de <i>R. palmarum</i> infectados por <i>T. paradoxa</i> externamente e internamente no município de Maceió – Al.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – ágar MacConkey

AN – ágar nutriente

AS – ágar sangue

ASD – ágar Sabouraud dextrose

BAL – bactérias ácido lácticas

BDA – batata dextrose ágar

BGN – bacilos Gram-negativos

BGP – bacilos Gram-positivos

BHI – Infusão de cérebro e coração

CGN – cocos Gram-negativos

CGP – cocos Gram-positivos

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

CMC – carboximetilcelulose

EAAs – aminoácidos essenciais

FISH – hibridização *in situ* fluorescente

IE – índice enzimático

LEV – levedura

MALDI-TOF – ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo

MH – Mueller Hinton

MIP – manejo integrado de pragas

MS – espectrometria de massa

NF- κ B – fator nuclear kappa B

OTU – unidade taxonômica operacional

PCR – reação em cadeia da polimerase

PRRs – receptores de reconhecimento de padrões

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

rRNA – ácido ribonucleico ribossômico

TSA – ágar triptona de soja

TTC – 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Rhynchophorus palmarum</i> L.....	17
2.1.1 Biologia.....	17
2.1.2 Danos de importância econômica da praga.....	20
2.1.3 Patologias associadas ao <i>R. palmarum</i>	21
2.1.3.1 Anel vermelho.....	22
2.1.3.2 Resinose do coqueiro.....	24
2.2 Medidas de controle.....	25
2.2.1 Controle cultural.....	26
2.2.2 Controle comportamental	26
2.2.3 Controle químico	27
2.2.4 Controle biológico.....	27
2.3 Simbiose em insetos	28
2.4 Microbiota intestinal de insetos.....	30
2.4.1 O intestino de insetos.....	32
2.4.2 Funções da microbiota intestinal.....	33
2.5 Fatores que influenciam a microbiota intestinal de insetos	38
2.6 Métodos para explorar a microbiota intestinal.....	39
2.6.1 Ensaios dependentes de cultura.....	39
2.6.2 Ensaios independentes de cultura.....	40
2.7 Celulases e microbiota intestinal de insetos.....	41
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Captura de <i>R. palmarum</i> e manutenção em laboratório.....	45
4.2 Isolamento de microrganismos cultiváveis do trato digestivo de <i>R. palmarum</i>	45
4.2.1 Extração intestinal	45
4.2.2 Cultivo dos microrganismos.....	46
4.2.3 Isolamento e caracterização das colônias.....	47

4.3 Identificação dos isolados por espectrometria de massa MALDI-TOF.....	49
4.4 Atividade celulolítica.....	51
4.5 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos.....	51
4.5.1 Disco difusão	52
4.5.2 Microdiluição em caldo	54
4.6 Pesquisa de <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	55
4.7 Análise estatística	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Microbiota cultivável associada ao trato intestinal de <i>R. palmarum</i>	58
5.2 Atividade celulolítica.....	72
5.3 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos.....	75
5.4 Identificação de <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	78
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE	111

1 INTRODUÇÃO

A broca da palmeira da América do Sul, *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae), é uma praga importante das plantações de coco (*Cocos nucifera*) na América tropical, especialmente na Venezuela, México, Brasil e áreas do Caribe (LÖHR et al., 2015; BATALHA et al., 2020; HODDLE; HODDLE; MILOSAVLJEVIC, 2020). Essa cultura é uma das mais importantes no Nordeste brasileiro, especialmente na faixa litorânea, e corresponde aproximadamente a 75,0% da produção nacional (IBGE, 2019).

Dentre os insetos que causam danos ao coqueiro, *R. palmarum* requer maior atenção e monitoramento devido aos impactos econômicos que pode gerar. Estas coleobrocas apresentam notável habilidade em localizar a planta hospedeira a longas distâncias por meio do olfato (LACERDA, 2001; SABINO, 2014; HODDLE; HODDLE; MILOSAVLJEVIC, 2020) e, quando se alimentam de quantidades consideráveis de tecido interno do vegetal, podem abrir galerias que danificam a planta, tornando-a suscetível a doenças e pragas. Em casos mais graves, podem destruir o meristema provocando sua morte (FERREIRA et al., 2014; SANTOS, 2016). Além disso, esse inseto é considerado o principal vetor de transmissão do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente etiológico da doença letal conhecida como anel-vermelho (PLATA-RUEDA et al., 2016), e ainda, possível vetor da resinose do coqueiro, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (COSTA e CARVALHO et al., 2013).

Muitos métodos têm sido utilizados para o controle de *R. palmarum*. As estratégias atuais de manejo incluem o controle cultural, mecânico, químico, biológico ou por meio de práticas comportamentais. No entanto, embora uma série de táticas sejam utilizadas, não existe, ainda, um método eficaz, econômico e ecologicamente viável, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de alternativas para o controle desta praga (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011; FERREIRA et al., 2014; PINHO et al., 2016).

Sabe-se que a microbiota intestinal de insetos é essencial para a sua sobrevivência, desempenhando papel fundamental em sua adaptação, desenvolvimento, crescimento, reprodução e evolução (TANG et al., 2012; TAGLIAVIA et al., 2014). A transformação de macromoléculas em nutrientes essenciais, como, por exemplo, a degradação enzimática de metabólitos vegetais, é uma função atribuída à microbiota intestinal, uma vez que os herbívoros não possuem

enzimas específicas para essa atividade (PRYIA et al., 2012; YUN et al., 2014). Além disso, insetos que são submetidos a dietas pobres em nutrientes necessitam de bactérias simbiotes que auxiliem na síntese de aminoácidos, reciclagem de ácido úrico e fixação de nitrogênio atmosférico (AYRES et al., 2000; BUSTAMANTE-BRITO et al., 2019). Com relação aos fungos, a associação de leveduras no intestino de insetos tem sido relatada como de grande importância ecológica, uma vez que herbívoros utilizam nutrientes, especialmente carboidratos e esteroides, derivados do metabolismo desses microrganismos (RINKE, 2009; ZIGANSHINA et al., 2018).

Ademais, a microbiota intestinal de insetos não está associada apenas com a aquisição de nutrientes, desempenhando importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema imunológico do hospedeiro (ENGEL; MORAN, 2013; MUHAMMAD et al., 2019), entretanto, a complexidade, dinâmica e os tipos de interações entre os insetos e sua microbiota intestinal, não estão totalmente esclarecidos (TAGLAVIA et al., 2014; XU et al., 2015).

Estudos destacam também a importância de simbiotes intestinais na produção de enzimas de interesse industrial, como as celulases. Quando capazes de degradar a biomassa vegetal rica em celulose, os microrganismos presentes no intestino dos insetos herbívoros constituem um dos biorreatores naturais mais eficientes, fornecendo enzimas importantes para a degradação desse importante polissacarídeo (DANTUR et al., 2015).

A ampla gama de funções desempenhadas pela microbiota dos insetos tem chamado a atenção da comunidade científica, que busca explorar simbiotes associados a esses animais para desenvolver estratégias de controle de pragas, ou ainda como fonte de moléculas para aplicações biotecnológicas, tais como enzimas para a indústria. Informações sobre a microbiota intestinal de *R. palmarum* e a participação desses simbiotes em determinados processos enzimáticos, como por exemplo a degradação de celulose, são ainda exíguas. Por essa razão, esse estudo visou identificar a microbiota intestinal cultivável e os processos metabólicos associados ao intestino desse importante inseto-praga que afeta várias culturas do nordeste brasileiro e, dessa forma, contribuir no desenvolvimento de novas estratégias para o controle simbiótico de *R. palmarum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhynchophorus palmarum* L.

Rhynchophorus palmarum Linnaeus, 1764 (Coleoptera: Curculionidae), conhecida como broca da palmeira da América do Sul ou broca-do-olho-do-coqueiro, é considerada uma praga agrícola de grande importância para a economia global, sendo relatada como especialmente crítica nas plantações comerciais de palmeiras (SANTANA et al., 2017; MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Este inseto pode afetar 35 espécies de plantas de 12 famílias diferentes, mas é encontrado majoritariamente em Arecaceae (SANTOS, 2016). Seus principais hospedeiros são *Cocos nucifera* L. (coqueiro), *Elaeis guineenses* Jacq. (dendezeiro), *Euterpe edulis* Mart. (palmito-juçara), *Metroxylon sagu* Rottb. (Sagu), *Phoenix canariensis* Chaub. (Palmeira-das-canárias), *Phoenix dactylifera* L. (Tamareira) e *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) (PLATA-RUEDA et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2019; HODDLE; HODDLE; MILOSAVLJEVIC, 2020). Servem ainda como fonte atrativa e alimentar para os insetos adultos, o mamoeiro *Carica papaya* L., o abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merr. e a bananeira *Musa paradisiaca* L., acarretando em perdas e danos a essas plantações (FERREIRA et al., 1994; NAVARRO et al., 2002).

O gênero *Rhynchophorus* tem uma extensa distribuição mundial, mas concentra-se principalmente nos trópicos (Caribe, Américas Central e do Sul: Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela) (COSTA, 2016; HODDLE; HODDLE; MILOSAVLJEVIC, 2020). No Brasil, sua distribuição ocorre na região Norte, Sudeste e particularmente na região litorânea da região Nordeste, onde apresenta maior importância para a economia nacional (MOLIN; BARRETO, 2012; JESUS JÚNIOR et al., 2013).

2.1.1 Biologia

R. palmarum apresenta metamorfose completa, ou seja, a larva eclode do ovo, passa para a fase de pupa e, em seguida, atinge a fase adulta (NAVARRO et al., 2002). Quando adulto, este besouro apresenta cor preta, medindo cerca de 45 a 60

mm de comprimento, 15 a 18 mm de largura e rostro recurvado com 10 a 12 mm de comprimento (figura 1). Apresentam ainda asas curtas que deixam exposta a parte terminal do abdômen, constituídas por oito sulcos longitudinais (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2011; FERREIRA et al., 2014).

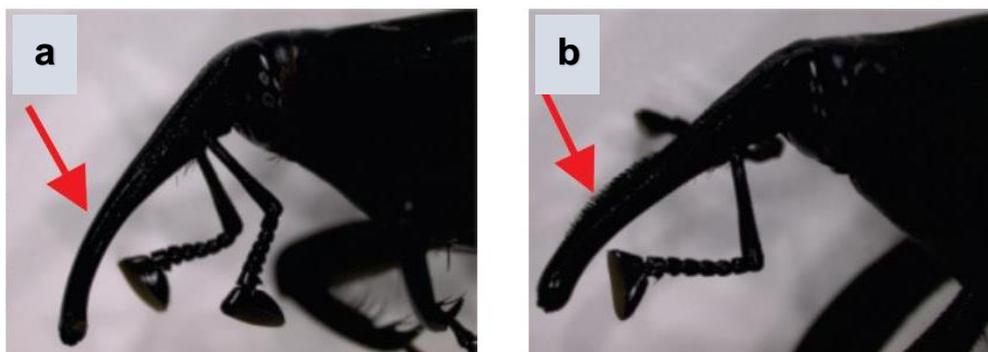
Figura 1. Inseto adulto da espécie *Rhynchophorus palmarum*.



Fonte: De La Torre et al., 2015.

O rostro é considerado importante para a diferenciação do sexo, sendo este mais comprido, delgado e curvo nas fêmeas, enquanto nos machos verifica-se a presença de pelos rígidos e macios na parte dorsal (figura 2) (CYSNE et al., 2013). Ademais, o inseto adulto possui hábito diurno e crepuscular e seu ciclo de vida varia, em média, de 2 a 3 meses (FERREIRA et al., 2014).

Figura 2. Dimorfismo sexual nos adultos de *Rhynchophorus palmarum*, evidenciado pelas características do rostro. (a) fêmea; (b) macho.



Fonte: Cysne et al., 2013.

As fêmeas de *R. palmarum* depositam seus ovos na parte tenra da planta, podendo colocar entre 5 a 6 unidades por dia, totalizando 250 ovos durante sua vida (GALLO et al., 2002; TAKADA; BATISTA FILHO; HOJO, 2014). Os ovos são elípticos e lisos, possuem coloração cristalina, tornando-se branco creme ao segundo dia, medem cerca de 25 mm x 1 mm e são cobertos por uma substância de coloração amarelo creme (PAMPLONA, 2016). Dois a três dias após a oviposição, eclodem as larvas (LIMA, 2014). Estas são ápodas, de coloração creme e cabeça amarronzada, possuem corpo recurvado subdividido em 13 anéis enrugados e, quando totalmente desenvolvidas, chegam a medir 75 mm de comprimento e 25 mm de largura (figura 3) (GALLO et al., 2002; SÁNCHEZ-SOTO; NAKANO, 2002; FERREIRA et al., 2014). Durante a fase larval é comum o comportamento de canibalismo (PAMPLONA, 2016).

Figura 3. Larva de *Rhynchophorus palmarum*.



Fonte: Autor, 2021.

Cinco a seis dias antes de empupar, a larva cessa a alimentação e produz um casulo espiralado com fibras vegetais da planta hospedeira. No interior do casulo formado inicia-se a modificação de larva para pupa, e posteriormente para adulto (PAMPLONA, 2016). A pupa é do tipo exarada e possui coloração amarelada, podendo medir de 70 a 90 mm de comprimento (SÁNCHEZ-SOTO; NAKANO, 2002; LIMA, 2014). O adulto ao emergir permanece alguns dias no interior do casulo até o total endurecimento do tegumento (CYSNE et al., 2013). Após esse período, o inseto faz um furo com o rostro na parte anterior do casulo e sai à procura de outras plantas hospedeiras, iniciando assim um novo ciclo (FERREIRA et al., 2014).

2.1.2 Danos de importância econômica da praga

As plantas da família Arecaceae formam um grupo de monocotiledôneas altamente diversificadas que estão presentes em regiões tropicais e subtropicais do mundo (TREGGAR et al., 2011). Sua importância econômica deve-se ao seu alto valor ornamental e potencial de uso em produtos alimentícios (BAKER et al., 2009; MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Uma das principais plantas da família Arecaceae e que possui notável importância econômica para o Brasil e diversos outros países da América Latina e Caribe é o coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (PIRES et al., 2004). Em algumas regiões do mundo, essa palmeira é cultivada visando a comercialização da copra (polpa seca do coco) para a produção de óleo. No Brasil, o coqueiro é cultivado com a finalidade de produzir frutos destinados à agroindústria para produção de coco ralado e leite de coco, além da água de coco (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014).

Na atualidade, o Brasil é o quarto maior produtor de coco do mundo, responsável por uma produção de cerca de 2,7 milhões de toneladas de frutos por ano, em uma área plantada de 234.012 ha, correspondendo a uma produtividade de 11 toneladas por ha (SOBRAL et al., 2019). Apesar desta cultura estar presente em várias regiões do país, as maiores plantações e produções se concentram no Nordeste, localizadas predominantemente na região litorânea, correspondendo a cerca de 3/4 da produção nacional (JESUS JÚNIOR et al., 2013; IBGE, 2019).

Alagoas é considerado um estado tradicional na produção de coco, correspondendo atualmente ao sétimo maior produtor de coco no Brasil e o quinto do Nordeste, estando atrás da Bahia, Ceará, Sergipe, Pará, Pernambuco e Espírito Santo (IBGE, 2019). O cultivo de coco em Alagoas, especialmente no litoral Sul, representa uma importante fonte de renda para os produtores e para a economia do estado (CAROZO, 2010). Atualmente, o agronegócio do coco tem relatado perdas de produtividade e prejuízo econômico causadas principalmente pelo inseto *Rhynchophorus palmarum* L., o que evidencia a necessidade de monitoramento e controle da praga a fim de sustentar a produção de forma eficaz (MACLEOD; HUSSEIN, 2017).

2.1.3 Patologias associadas ao *R. palmarum*

R. palmarum pode causar danos ao vegetal de duas maneiras, de modo direto ocasionado pelo ataque das larvas que abrem galerias destruindo os tecidos apicais internos da planta (MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018) ou de forma indireta através dos adultos que são vetores, principalmente, da doença do anel vermelho (PLATA-RUEDA et al., 2016) e da resinose do coqueiro (COSTA e CARVALHO et al., 2011).

Quando uma palmeira é infectada por uma destas doenças, estas podem se espalhar rapidamente entre as plantações ao redor como resultado da busca e exploração de recursos alimentares por *R. palmarum* (MOYA-MURILLO et al., 2015) e, por esta razão, o monitoramento populacional desta praga na cultura do coqueiro é uma ferramenta necessária para a implementação de qualquer estratégia de controle envolvendo uma abordagem de manejo integrado de pragas (MIP), o qual consiste em uma tática para combater pragas e doenças de plantas, de forma harmoniosa, levando em consideração o impacto sobre os produtores, sociedade e o ambiente, numa estratégia baseada em análises de custo/benefício, visando minimizar a utilização de pesticidas químicos (CARREÑO-CORREA et al., 2013; STENBERG et al., 2017; MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018).

O coqueiro torna-se suscetível ao ataque do *R. palmarum* a partir do terceiro ano de plantio (FERREIRA et al., 2014). O inseto possui hábito diurno, atacando especialmente nas horas com temperaturas mais amenas, sendo capaz de se deslocar 1,6 km por dia (DUARTE, 2015). Após penetrar na parte apical da planta, a fêmea põe os ovos nos tecidos macios. As larvas se desenvolvem e se alimentam durante todo seu ciclo nessa região, danificando o meristema (FERREIRA et al., 2014), o que impede a planta de produzir os hormônios auxina e giberelina, fundamentais para o seu crescimento (figura 4) (PAMPLONA, 2016). Além disso, destroem o sistema vascular, provocando o colapso e até mesmo a morte devido às lesões produzidas (MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Os tecidos danificados entram em processo de fermentação e adquirem um odor fétido. Externamente, as folhas mais novas murcham e se curvam, indicando a morte da planta. A exsudação da seiva e os odores da fermentação, resultantes dos ferimentos provocados pelas larvas, atraem novos besouros da mesma espécie para a planta infectada (CYSNE et al., 2013; FERREIRA et al., 2014). Ao encontrar a planta hospedeira, o macho passa a exalar feromônios de agregação, atraindo fêmeas e

outros machos que, por sua vez, se agrupam sobre a fonte de alimento e iniciam a copulação, reiniciando o ciclo (NAVARRO et al., 2002). De acordo com Duarte e Lima (2001), 30 larvas são suficientes para causar a morte de uma planta adulta.

Figura 4. Danos causados pela alimentação de larvas de *R. palmarum* em coqueiro.



Fonte: Ferreira et al., 2014.

2.1.3.1 Anel vermelho

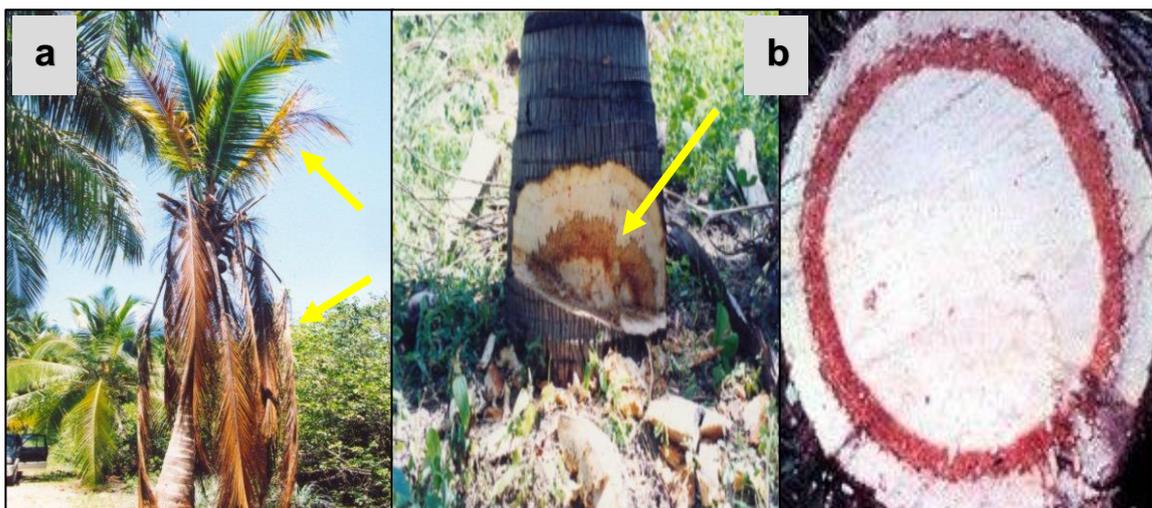
R. palmarum é considerado o vetor mais importante do nematoide *B. cocophilus* (Cobb 1919) Baujard, 1989 (Nematoda: Tylenchida), agente etiológico da doença do anel vermelho em vegetais da família Arecaceae (MAGALHÃES; MORAES NETO; MIGUENS, 2008). Esta doença é considerada a mais significativa dentre aquelas que atingem o coqueiro, ocasionando a morte de até 15% das árvores de um plantio (PLATA-RUEDA et al., 2016).

O inseto pode contrair o parasita na fase adulta quando se alimenta de plantas contaminadas ou durante a fase larval, no momento em que as larvas entram em contato com tecidos infectados. Além do contágio por *R. palmarum*, a transmissão do nematoide pode ocorrer por meio de ferramentas utilizadas na colheita e tratos culturais, solo infestado, raízes, água de irrigação e matéria orgânica contaminada (LIMA, 2014). A proporção de insetos portadores do nematoide varia conforme a

localização geográfica e entre lotes de uma mesma plantação (SÁNCHEZ; CERDA, 1993).

A doença do anel vermelho foi nomeada com base na faixa vermelha característica sempre presente na haste das palmeiras afetadas (MAGALHÃES; MORAES NETO; MIGUENS, 2008). Os sintomas variam de acordo com as condições ambientais, idade e variedade das plantas e o inseto acomete principalmente culturas adultas, entre 5 e 15 anos (BOARI et al., 2016). Os sintomas externos estão confinados às folhas, que se tornam amareladas na ponta até a base do ráquis foliar e, em seguida, tornam-se marrons e quebradiças (figura 5a). Com relação aos sintomas internos, após o corte transversal do tronco da palmeira, observa-se a presença de um anel-vermelho (2 a 4 cm de largura) (DUARTE et al., 2008), ocasionado pela deposição circular de antocianina no córtex da região acometida (figura 5b). Este anel é geralmente vermelho em culturas altas, mas pode ser acastanhado em cultivares anãs e híbridas e, normalmente, os sintomas internos estão totalmente desenvolvidos quando os externos se tornam visíveis (MAGALHÃES, MORAES NETO e MIGUENS, 2008).

Figura 5. Coqueiro afetado pela doença do anel vermelho. (a) sintomas externos: folhas subdesenvolvidas, folíolos do coqueiro exibindo faixas amarelas e bronzeadas, secagem das folhas e podridão do cacho de frutos; (b) sintoma interno: manchas avermelhadas ou amarronzadas na forma de anel, constituídas por tecido necrosado.



Fonte: Warwick; Talamini, 2010.

O anel pode ser observado na parte mais alta ou mais baixa do estirpe, dependendo de onde a infecção iniciou. Quando a infecção ocorre pelas raízes, o anel vermelho se desenvolve de baixo para cima, contudo quando o inseto-vetor faz a

transmissão do nematoide de uma planta doente para outra sadia, o anel é observado nas partes mais altas (CASTRO; LIMA; SANTANA, 2009).

2.1.3.2 Resinose do coqueiro

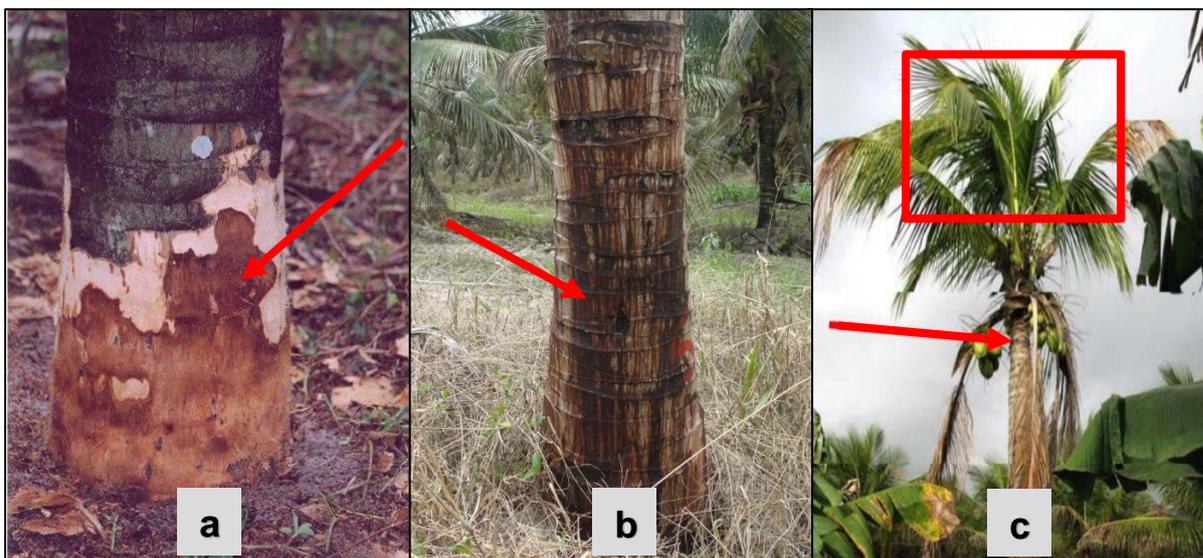
R. palmarum também apresenta importância econômica por ser vetor da resinose do coqueiro, causada pelo fungo *T. paradoxa* (De Seynes) Höhn (1904), forma assexuada do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau, (1952) (COSTA e CARVALHO et al., 2013). *T. paradoxa* é capaz de sobreviver nos restos de cultura em decomposição e resiste por longos períodos no solo por meio da formação de estruturas de resistência denominadas clamidósporos (NASCIMENTO et al., 2020).

Estudos evidenciaram que o inseto transporta em seu tubo digestivo esporos do fungo (PARRA et al., 2003; WARNICK; TALAMINI, 2009; COSTA e CARVALHO, 2011). Como esse fitopatógeno completa seu ciclo de vida dentro do hospedeiro e possui rápida dispersão no corpo do inseto, é provável que sua transmissão ocorra tanto pelos esporos, que são carregados externamente em sua carapaça, quanto pela alimentação do *R. palmarum* em plantas doentes, transferindo a infecção para plantas saudas (SANTOS, 2016). *T. paradoxa* pode também ser dispersado pela chuva, vento, ferimento e ferramentas usadas na colheita, tratos culturais ou erradicação de plantas doentes (ALVAREZ et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2020).

Dentre os principais sintomas da doença, destacam-se o aparecimento de um líquido marrom-avermelhado que escorre através de rachaduras no tronco, adquirindo coloração avermelhada ou enegrecida ao secar, apodrecimento do tecido interno, redução na assiduidade de emissão de folhas e no tamanho das mais novas, afinamento do tronco na região próximo à copa e folhas amarelo-pardacentas facilmente quebráveis (figura 6) (WARWICK; PASSOS, 2009; COSTA e CARVALHO et al., 2011; COSTA e CARVALHO et al., 2013).

No nordeste brasileiro, este fungo tem se tornado razão de grande preocupação entre produtores, instituições de pesquisa, órgãos de assistência técnica e de defesa sanitária, devido a sua rápida disseminação e conseqüente queda de produção em coqueirais, os quais são suscetíveis à *T. paradoxa* e sujeitos à grandes perdas (COSTA e CARVALHO et al., 2011).

Figura 6. Plantação afetada pela resinose do coqueiro. (a) Apodrecimento do tecido interno; (b) Líquido marrom-avermelhado no tronco; (c) afinamento do tronco na região próximo a copa.



Fonte: Warwick; Talamini, 2010.

A recomendação para o controle dessa doença consiste na retirada das áreas lesionadas do estipe, seguida de tratamento com o fungicida tiofanato metílico e cobertura da área tratada com piche ou alcatrão vegetal. O controle químico é eficiente na redução da reincidência da doença nas plantas já tratadas, mas ineficiente no surgimento de novos casos da doença no tempo, seja isoladamente ou em focos (TREMACOLDI; LINS, 2011). Em casos graves, as plantas devem ser erradicadas para eliminar pontos de proliferação do agente (COELHO, 2013).

2.2 Medidas de Controle

Métodos rápidos e eficazes de controle de insetos-praga representam uma das muitas conquistas científicas do século XX. O padrão e qualidade de vida no mundo desenvolvido foram transformados pelo manejo de insetos que consomem nossas plantações e transmitem doenças para humanos, animais e vegetais (KAJLA, 2020).

Visando diminuir a população de *R. palmarum* no campo são utilizados vários métodos de controle, tais como o cultural, comportamental, químico e biológico (CYSNE et al., 2013; PINHO et al., 2016).

2.2.1 Controle Cultural

Entre os métodos de controle de *R. palmarum*, o mais comum é a remoção de plantas doentes e mortas pelos danos diretos ou indiretos causados pelos insetos, para redução de criadouros e evitar a atração de novos besouros (MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018).

Quando identificada a doença, a planta deve ser cortada em partes menores para que o tecido vegetal seja completamente queimado. Outra prática de controle consiste no enterro da planta em valas de 40 a 60 cm de profundidade, com o intuito de prevenir a liberação de voláteis atrativos ao besouro, e conseqüentemente, a multiplicação da praga por meio da postura de ovos e desenvolvimento de larvas (MOURA; VILELA, 1998; FERREIRA et al., 2014). Contudo, o sucesso dessa medida de controle requer uma política severa de fiscalização na plantação, de modo que todas as plantas sejam vistoriadas, no mínimo mensalmente, e para isso é necessária a avaliação por pessoas treinadas no reconhecimento dos primeiros sintomas do anel vermelho e na diferenciação de outras doenças (MOURA et al., 2006).

2.2.2 Controle comportamental

Esse método de controle fundamenta-se em estudos da fisio-ecologia dos insetos, e tem como base a utilização de hormônios (PAMPLONA, 2016). Visando diminuir os danos causados à cultura, recomenda-se a instalação de armadilhas tipo balde na periferia do plantio, protegidas do sol, contendo atrativo alimentar, normalmente pedaços de cana-de-açúcar, associados ao feromônio de agregação Rincoforol, o que facilita capturar e eliminar os insetos adultos (FERREIRA et al., 2003; MOYA-MURILLO et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2016; MILOSAVLJEVIC et al., 2020).

Como desvantagem, esse método requer vistorias periódicas e constantes às armadilhas para a sua manutenção ou para a remoção dos adultos, pois quando manejadas de forma inadequada, as iscas podem atrair ainda mais insetos às plantações, aumentando assim a população da praga e os níveis de infestação, resultando em um efeito inverso (FERREIRA, 2008). A vantagem desse método de controle em relação aos outros, como por exemplo o químico, reside no fato de não apresentar riscos de intoxicação para o homem e o ambiente (PAMPLONA, 2016).

2.2.3 Controle químico

Consiste na utilização de produtos químicos que possuem ação sobre as diferentes fases do desenvolvimento *R. palmarum*, especialmente sobre insetos adultos, por meio da instalação de armadilhas contendo atrativos alimentares impregnados com inseticidas ou através da aplicação direta de inseticidas nas axilas foliares das plantas (MARTÍNEZ et al., 2019).

Como pontos negativos, medidas de controle químico podem agredir o meio ambiente e colocar em risco a saúde do consumidor (MURGUÍA-GONZÁLEZ et al., 2018). Os inseticidas usados nas armadilhas costumam causar a morte de insetos e vertebrados benéficos que também são atraídos pelas fontes alimentares utilizadas. A contaminação ambiental com inseticidas também pode ocorrer durante a renovação da isca ou quando as iscas contaminadas são descartadas. Além disso, a água da chuva pode entrar nas armadilhas, lixiviar produtos químicos das iscas e, em seguida, escoar para a superfície do solo (SUMANO et al., 2012).

2.2.4 Controle biológico

A premissa fundamental do controle biológico baseia-se no manejo de insetos-praga e/ou vetores de doenças a partir do uso de inimigos naturais, que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitas, e principalmente microrganismos, como fungos, vírus e bactérias (JULIANO, 2008).

Uma tática de controle biológico muito estudada utiliza fungos entomopatogênicos, opção que apresenta potencial de emprego sobre diversas espécies de insetos, com destaque para os fungos dos gêneros *Beauveria*, *Trichoderma* e *Metarhizium*, que são mais empregados devido ao amplo espectro de hospedeiros e facilidade de produção em laboratório (FERREIRA et al., 2014; LIMA, 2014). Estudos têm demonstrado que tanto os insetos adultos quanto o material vegetal, uma vez inoculados com formulados contendo esporos desses fungos, são capazes de transmitir os conídios fúngicos a outros indivíduos da praga, com base no instinto de agregação da espécie, provocando a morte dos insetos (VERDE et al., 2015; DEMBILIO et al., 2018; DAZA et al., 2019).

Ademais, fungos entomopatogênicos podem ter ação frente às futuras gerações, diminuindo a oviposição, a viabilidade de ovos e aumentando a

sensibilidade da população a outros agentes biológicos e químicos (ALMEIDA et al., 2009; HAJJAR et al., 2015). Essa técnica de controle biológico, entretanto, requer planejamento e gerenciamento intensivos, o que demanda um tempo significativo (BRUMATTI; SOUZA, 2009).

Outra estratégia de controle interessante e que é foco de conhecimento deste estudo, consiste na utilização de microrganismos simbióticos, os quais podem oferecer uma rota para atender à necessidade por novas estratégias de controle e manejo de insetos-praga. Nesse sentido, duas abordagens possuem potencial particular: a primeira é fundamentada na perturbação de simbiontes microbianos obrigatórios presentes em unidades celulares próprias (micetócitos), os quais desempenham papel essencial para o ciclo de vida do inseto e são, obrigatoriamente, transmitidos verticalmente através do ovário do animal. Esta estratégia utiliza compostos ativos que tenha ação contra simbiontes presentes nos micetócitos e visa interferir em microrganismos responsáveis por sintetizar nutrientes importantes, como por exemplo aminoácidos e vitaminas, dos quais o inseto depende, sem, no entanto, causar a morte imediata do animal (DOUGLAS, 2007; DOUGLAS, 2011; ENGEL; MORAN, 2013).

A segunda abordagem é realizada por meio da manipulação de microrganismos que desempenham funções em características que contribuem para o sucesso dos insetos como praga, como por exemplo, microrganismos que aumentam a capacidade vetorial e a resistência contra inimigos naturais. O objetivo desta estratégia não é erradicar a praga, mas eliminar seus efeitos nocivos, sendo particularmente útil para o controle de insetos vetores de doenças (DOUGLAS, 2007). Uma descrição mais detalhada da importância de simbiontes e sua utilização no controle de insetos é comentada no tópico seguinte.

2.3 Simbiose em insetos

A simbiose é definida como uma associação entre dois organismos de espécies diferentes, benéfica ou não para ambos (DOUGLAS, 2009). As relações existentes nas interações entre insetos e simbiontes evidenciam um ambiente com elevada diversidade microbiana e a existência de associações fundamentais para a compreensão de processos bioecológicos dos hospedeiros (ALMEIDA, 2013). Os insetos constituem o grupo mais diverso e abundante no que diz respeito à número

de espécies, hábitos ecológicos e biomassa (BASSET et al., 2012), e é provável que o sucesso evolutivo destes animais tenha dependido, em parte, de suas inúmeras relações com microrganismos simbiotes, em vista de sua habilidade de explorar diferentes habitats e fontes de alimento (FELDHAAR; GROSS, 2009; ENGEL; MORAN, 2013).

Microrganismos simbiotes podem apresentar associações obrigatórias ou facultativas com seus hospedeiros, também chamadas de primárias e secundárias (SANCHEZ-CONTRERAS; VLISIDOU, 2008; ALMEIDA, 2018). Em relações obrigatórias, a microbiota simbiote pode estar presente em unidades celulares próprias isoladas (bacteriócito ou micetócito) ou agrupadas formando um órgão específico (bacterioma), o qual localiza-se na hemocele do inseto, não possuindo a capacidade de sobreviver fora do hospedeiro (DOUGLAS, 2011; ALMEIDA, 2013). Como características, esses simbiotes são transmitidos maternalmente para as próximas gerações, apresentam maior conteúdo AT (adenina-timina) no genoma, tamanho reduzido e são particularmente importantes na evolução do inseto (MORAN; BAUMANN, 2000; WERNEGREN, 2012; KARAMIPOUR; MEHRABAI; FATHIPOUR, 2016).

Por outro lado, simbiotes facultativos podem ser encontrados nas cavidades do corpo do hospedeiro, fora do ambiente celular, sendo denominados de microrganismos extracelulares, habitando especialmente o lúmen intestinal dos insetos (MÜLLER, 2013), embora também possam ser encontrados dispersos na hemolinfa (BURKE et al., 2009). Em associações simbióticas facultativas, os insetos independem dos microrganismos para sua sobrevivência (FERRARI; VAVRE, 2011), entretanto, quando presentes, estes podem influenciar diversos aspectos ecológicos, resultando numa maior aptidão biológica de seus hospedeiros, atuando na fixação de nitrogênio, possivelmente utilizado para formação de proteínas, aumento na resistência contra parasitas e tolerância a altas temperaturas (ENGEL; MORAN, 2013).

Microrganismos associados a insetos podem desempenhar papéis importantes na fisiologia do animal, ajudando seus hospedeiros a se adaptarem às mudanças nas condições e contribuindo para o seu potencial invasivo (JING; QI; WANG, 2020). Esses simbiotes podem fazer parte de uma microbiota central que é transmitida de forma estável ao longo do ciclo de vida do hospedeiro ou recrutada seletivamente do ambiente em cada estágio de desenvolvimento (ENGEL; MORAN, 2013).

Estudos de investigação da microbiota intestinal e da fisiologia de insetos consistem em uma alternativa promissora para o controle de pragas, uma vez que alterações em processos metabólicos levam a um desequilíbrio fisiológico nos insetos, podendo ocasionar sua morte. O trato intestinal dos insetos é uma importante interface entre o animal e o meio ambiente. Logo, desvendar eventos associados a essa interface podem revelar novos alvos a serem explorados pelos programas de controle e manejo de pragas e vetores (YUN et al., 2014; DOUGLAS, 2015).

Algumas espécies de insetos fornecem modelos de laboratório úteis para o desenvolvimento de pesquisas com comunidades microbianas e suas interações com os hospedeiros, especialmente na compreensão do papel desempenhado sobre a imunidade e interações metabólicas (ENGEL; MORAN, 2013). Para insetos vetores de doenças, como é o caso de *R. palmarum*, os microrganismos simbióticos podem influenciar a eficiência da vetorização (MCMENIMAN et al., 2009; RICCI et al., 2012) ou o tempo de desenvolvimento (CHOUAIA et al., 2012) e, assim, fornecer alvos para o controle de doenças em potencial. Dessa forma, conhecer o papel da microbiota de insetos provou ser uma ferramenta poderosa para obter uma compreensão dos papéis biológicos de simbiontes individuais em sistemas complexos onde um inseto abriga múltiplas bactérias endossimbióticas (ENGEL; MORAN, 2013).

Nesse sentido, Pumpuni et al. (1993) investigaram os efeitos de bactérias no desenvolvimento esporogônico do parasita da malária (*Plasmodium falciparum*) em mosquitos *Anopheles stephensi* e observaram que a microbiota intestinal pode ter um papel protetor contra este parasita. Quando os mosquitos foram alimentados com gentamicina, estes se infectaram mais facilmente com *Plasmodium*, além disso, as infecções também diminuiriam quando os mosquitos foram co-alimentados com *Plasmodium* e bactérias Gram-negativas em comparação à alimentação apenas com o parasita, o que reforça a importância de estratégias de controle simbiótico a partir de intervenções na microbiota intestinal visando reduzir a competência vetorial, por meio da adição de bactérias específicas ou nutrientes (DOUGLAS, 2007).

2.4 Microbiota intestinal de insetos

Assim como nos vertebrados, diversos grupos de microrganismos também colonizam o intestino dos insetos, constituindo sua microbiota intestinal (MUHAMMAD et al., 2019). A caracterização desta microbiota é importante para a compreensão

aprofundada das relações entre os microrganismos simbiotes e seu hospedeiro (WANG et al., 2020). Considerando o potencial no controle de pragas em agricultura e ecologia, essa complexa relação tem sido alvo de várias pesquisas nos últimos anos (ENGEL; MORAN, 2013; ADAK; KHAN, 2018).

A obtenção dos primeiros colonizadores intestinais de alguns insetos ocorre após a eclosão do ovo por meio da ingestão da camada externa, que contém microrganismos, pelas larvas. Essa camada é secretada quando a fêmea oviposita, caracterizando uma passagem de microbiota de geração para geração. Além disso, a microbiota também pode ser proveniente do meio ambiente ou da dieta alimentar (RINKE, 2009).

Com a modificação das fases do ciclo de vida dos insetos também se observa uma variação na composição da microbiota. De modo geral, o hospedeiro não pode sobreviver sem os endossimbiontes, uma vez que a eliminação destes microrganismos pode acarretar em um efeito prejudicial (TAGLIAVIA et al., 2014). Embora a vantagem para o hospedeiro seja aparentemente clara, para o endossimbionte nem sempre é (RINKE, 2009).

A microbiota intestinal em insetos é constituída por protistas, fungos, arqueas e bactérias (WANG et al., 2020). De acordo com as estatísticas, aproximadamente 99% dos microrganismos que compõem essa microbiota não são cultiváveis (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004; AKONDI; LAKSHMI, 2013). Falando especificadamente sobre bactérias, pesquisas destacam que organismos dos filos Proteobacteria e Firmicutes são predominantes como colonizadores do intestino de insetos (DOUGLAS, 2011; ZHANG et al., 2018).

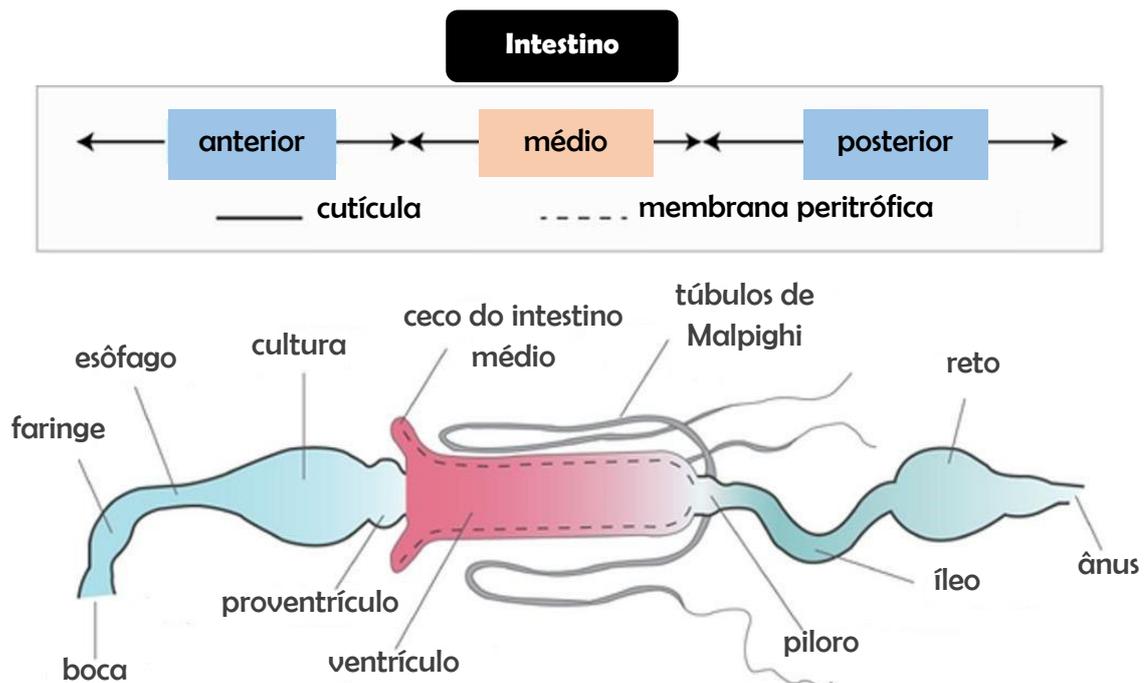
Muitas vezes as comunidades microbianas intestinais podem ser tão diversas que excedem o número de células do próprio inseto (RINKE, 2009), entretanto, muitos microrganismos presentes não apresentam nenhum significado para o animal, pois não aderem à sua superfície corporal ou intestinal e passam diretamente pelo intestino junto com o alimento, sendo assim temporariamente associados a ele (ROSADO, 2016). Outros microrganismos, em contrapartida, são importantes para a nutrição dos insetos contribuindo para a sua dieta, promovendo a disponibilidade, a aquisição e o processamento de alimentos (DOUGLAS, 2009; DOUGLAS, 2015).

2.4.1 O intestino de insetos

A estrutura básica do sistema digestivo de insetos é muito semelhante (figura 7), embora estes animais possuam uma diversidade de modificações associadas à adaptação a diferentes modos de alimentação (ENGEL; MORAN, 2013). Em geral, o intestino é constituído por três regiões principais: intestino anterior, intestino médio (ou ventrículo) e intestino posterior (CHAPMAN et al., 2013; WANG et al., 2020).

Os intestinos anterior e posterior originam-se do ectoderma embrionário e são revestidos por exoesqueleto composto de quitina e glicoproteínas cuticulares. Este exoesqueleto separa o lúmen intestinal das células epidérmicas e é eliminado em cada ecdise. O intestino anterior e o posterior podem ser subdivididos em seções funcionalmente distintas, de modo que o anterior apresenta uma região isolada, denominada divertículo, para armazenamento temporário de alimentos, enquanto o posterior possui câmaras de fermentação e canal retal separado para apreender as fezes antes da defecação. O intestino médio é o principal local de digestão e absorção de muitos insetos, não possui o revestimento exoesquelético e tem uma origem de desenvolvimento diferente, originando-se de células endodérmicas (LEHANE, 1997; ENGEL; MORAN, 2013).

Figura 7. Estrutura geral do intestino de insetos.



Fonte: Adaptado de Engel; Moran, 2013.

Em muitos insetos, as células epiteliais do intestino médio secretam um envelope denominado matriz peritrófica (ou membrana peritrófica), o qual é continuamente substituído a medida em que é expelido (ENGEL; MORAN, 2013). A matriz peritrófica divide o intestino médio em espaço endo e ectoperitrófico, e os microrganismos geralmente estão confinados ao primeiro, evitando seu contato direto com o epitélio do intestino médio. Com relação às funções, a matriz peritrófica produz uma barreira que protege o epitélio de danos mecânicos causados por partículas de alimentos, da exposição a moléculas de toxinas presentes nos alimentos e da invasão microbiana, e também concentra alimentos e enzimas digestivas (SHAO et al., 2001).

Os órgãos excretores dos insetos são os túbulos de Malpighi, estes são considerados prolongamentos do intestino grosso anterior que se estendem para a cavidade corporal e absorvem resíduos, como o ácido úrico, liberando-os para o intestino grosso posterior, proporcionando um ambiente rico em compostos nitrogenados e resíduos alimentares, favorável ao estabelecimento e crescimento de microrganismos (GASPAROTTO et al., 2011).

Além disso, a reabsorção de água é uma função bem reconhecida do intestino posterior (CHAPMAN et al., 2013), contudo esta região também pode ser útil na absorção de nutrientes, uma vez que a parede do intestino posterior de alguns insetos possuem canais intercelulares que permitem o movimento de nutrientes do lúmen deste órgão para a hemolinfa, incluindo ácidos graxos e aminoácidos produzidos por bactérias no cólon (KASHIMA; NAKAMURA; TOJO, 2006).

2.4.2 Funções da microbiota intestinal

A microbiota intestinal desempenha uma imensa gama de funções cruciais para o ciclo de vida dos insetos, incluindo crescimento, desenvolvimento, reprodução, nutrição e produção de vitaminas, patogênese, imunidade, proteção contra bactérias e fungos patogênicos, produção de componentes de feromônios, acasalamento e comportamento de forrageamento, homeostase intestinal, adaptabilidade ao meio ambiente e detoxificação de compostos, atuando para inibir a resistência de plantas (DOUGLAS, 2014; RUSSELL et al., 2014; SUGIO et al., 2015; MOHAMMED et al., 2018; HABINEZA et al., 2019; MUHAMMAD et al., 2019; JING; QI; WANG, 2020).

A maior parte das relações de simbiose em insetos tem como base associações nutricionais. Essa ocorrência pode ser verificada em insetos que utilizam como

substrato alimentar dietas com presença de moléculas complexas ou mesmo toxinas, as quais podem ser degradadas por simbioses intestinais (HIROSE; PANIZZI, 2009). Além disso, estes microrganismos são responsáveis pelo fornecimento de aminoácidos, vitaminas, lipídeos e cofatores para insetos que se alimentam de dietas desbalanceadas. Outras funções da microbiota relacionadas à nutrição incluem o aumento da eficiência de digestão, aquisição de enzimas digestivas, fixação de nitrogênio, reciclagem de ácido úrico, metanogênese e acetogênese a partir de hidrogênio (H₂) e dióxido de carbono (CO₂) (AYRES et al., 2000; MÜLLER, 2013). Ao contribuir com funções diretas ou indiretas para o hospedeiro, o microrganismo simbiote se beneficia do transporte, proteção contra antagonistas e ambientes extremos que o corpo do inseto fornece (KLEPZIG et al., 2009).

Estudos recentes destacam também a importância da microbiota intestinal na degradação de moléculas complexas, como a celulose e lignina (MANFREDI; PEROTTI; MARTÍNEZ, 2015; TOKUDA et al., 2018; ZHENG et al., 2019; OZBAYRAM; KLEINSTEUBER; NIKOLAUSZ, 2020; PRZEMIENIECKI et al., 2020). Dessa forma, microrganismos associados ao trato digestivo de diversos insetos são considerados essenciais para a sobrevivência desses animais por serem fontes potenciais de enzimas que degradam metabólitos vegetais, fornecendo aos seus hospedeiros glicose e ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia (YUN et al., 2014).

A microbiota intestinal interage com seus hospedeiros por meio de subprodutos metabólicos resultantes do catabolismo bacteriano da dieta do hospedeiro (HABINEZA et al., 2019). Os ácidos graxos de cadeia curta derivados da microbiota intestinal têm sido considerados cruciais para a saúde dos insetos à medida que executam funções metabólicas importantes, desempenhando papel na modulação do metabolismo local e sistêmico de lipídeos e carboidratos, fundamentais para a homeostase (CANFORA et al., 2015; KOH et al., 2016; FELLOWS et al., 2018).

O nitrogênio é um elemento essencial e crítico para o crescimento e desenvolvimento dos seres vivos, entretanto muitos organismos não conseguem utilizar sua forma de dinitrogênio (N₂) como fonte de nutrientes, sendo a fixação biológica restrita apenas a certos procariotos, denominados diazotróficos, os quais são capazes de reduzir o dinitrogênio atmosférico a amônia, forma utilizada por muitos organismos para produção de compostos nitro-orgânicos (BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020). Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido que bactérias podem desempenhar um papel fundamental na mediação das necessidades nutricionais de

nitrogênio de inúmeros insetos, por meio de associações diretas com diazotróficos residentes em seus intestinos, enriquecendo sua dieta (NARDI; MACKIE; DAWSON, 2002; DILLON; DILLON, 2004; MORALES-JIMENEZ et al., 2013).

Dentro da ordem Coleoptera, a evidência de fixação de nitrogênio foi encontrada principalmente em besouros que se alimentam de cascas e detritos lenhosos (BAR-SHMUEL; BEHAR; SEGOLI, 2020). Pesquisas que utilizaram ensaios dependentes de cultura e técnicas de biologia molecular confirmaram a presença de várias bactérias diazotróficas, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella* e *Stenotrophomonas* nesta ordem de insetos, evidenciando semelhanças em termos de suas comunidades diazotróficas, a maioria pertencente à família Enterobacteriaceae (MORALES-JIMENEZ et al., 2012; MORALES-JIMENEZ et al., 2013; MOHAMMED et al., 2018; MENG et al., 2019).

A fermentação de açúcares é outro importante processo metabólico atribuído à microbiota intestinal. Por meio da degradação de proteínas e da fermentação de carboidratos, microrganismos simbiotes podem fornecer aminoácidos essenciais (EAAs) aos insetos hospedeiros (LEITÃO-GONÇALVES et al., 2017; CHUNG et al., 2020). Estudos demonstram que Bactérias Ácido-Lácticas (BAL) possuem a capacidade de reconhecer açúcares, incluindo xilose, celobiose, glicose e frutose, desempenhando papel essencial na fermentação láctica (PESSIONE, 2012). Birkle et al. (2002) relataram que a bactéria simbiótica *Buchnera* é capaz de fornecer triptofano e outros EAAs aos seus hospedeiros afídeos devido à escassez destas substâncias orgânicas nos ingredientes alimentares destes insetos.

Além do fornecimento de aminoácidos, alguns estudos descrevem a produção e disponibilidade de vitaminas do complexo B por parte de bactérias endossimbiotes (SALEM et al., 2014; MORIYAMA et al., 2015; SNYDER; RIO, 2015). Nesta perspectiva, Fisher et al. (2019) estudaram a relação de simbiose que existe entre os insetos da espécie *Cimex lectularius*, conhecido como percevejo de cama, e bactérias do gênero *Wolbachia*, presentes em sua microbiota intestinal. Os autores verificaram que esta bactéria intracelular é sua fonte de vitamina B, desempenhando papel fundamental na sobrevivência do inseto. Além disso, outros estudos observaram que *Wolbachia* estimula a expressão de genes imunológicos em várias espécies de mosquitos, aumentando a resistência e a competência vetorial de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, transmissores importantes do

vírus da dengue, Chikungunya e Zika (KAMBRIS et al., 2010; HUGHES et al., 2011; PAN et al., 2012; MCFARLANE et al., 2014).

Outro componente nutricional importante são os esteroides disponibilizados por fungos endosimbiontes. Insetos não são capazes de sintetizar estes constituintes devido à ausência de enzimas necessárias para a formação do núcleo esteroidal e, por esta razão, estes animais utilizam os esteroides produzidos por fungos como precursores hormonais e para a composição da estrutura celular (DOUGLAS, 2009; JIA et al., 2013). Além disso, insetos da ordem Coleoptera apresentam associações mutualísticas com várias espécies de leveduras presentes na microbiota intestinal, consumindo carboidratos provenientes do metabolismo destes fungos (ZIGANSHINA et al., 2018).

Um papel importante desempenhado pelos simbiotes de insetos é a defesa, tanto contra inimigos naturais quanto sobre condições ambientais adversas (FLÓREZ et al., 2015; KRAMS et al., 2017). Bactérias intestinais, por exemplo, são capazes de produzir compostos tóxicos em resposta ao ataque promovido por uma série de patógenos. Dessa forma, insetos que possuem associação com estes simbiotes podem ser beneficiados com proteção adicional contra inimigos naturais (MÜLLER, 2013).

Martens et al. (2018) descrevem que algumas barreiras físicas, como matriz peritrófica e camada de muco, além da imunidade intestinal, desempenham papéis cruciais na manutenção da homeostase da microbiota intestinal (LEE et al., 2017; DAWADI et al., 2018; CAI et al., 2020). As células epiteliais do intestino podem secretar espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos para regular a microbiota intestinal em alguns insetos (HA et al., 2005; RYU et al., 2008; LEE et al., 2017), no entanto, os efeitos da microbiota intestinal no desenvolvimento e presença adequada de imunidade dos insetos e os mecanismos subjacentes aos impactos induzidos por esses microrganismos simbiotes na imunidade do hospedeiro ainda não estão totalmente esclarecidos (MUHAMMAD et al., 2019).

Sabe-se que a imunidade de insetos é mediada pelo reconhecimento de patógenos invasores por meio de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) e, em seguida, os sinais imunológicos são traduzidos via fator nuclear kappa B (NF- κ B), induzindo a secreção de efetores (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; HETRU; HOFFMANN, 2009). Nesse contexto, Muhammad et al. (2019) evidenciaram que a microbiota intestinal confere proteção ao preparar o sistema imunológico do

escaravelho-vermelho (*Rhynchophorus ferrugineus*), demonstrando que a presença da microbiota intestinal pode melhorar drasticamente a taxa de sobrevivência das larvas deste inseto quando desafiadas por bactérias via regulação positiva de genes imunes, importantes para aumentar a imunocompetência do hospedeiro, sugerindo que as bactérias intestinais têm forte efeito estimulador sobre o sistema imunológico, secretando peptídeos antimicrobianos. Ademais, os autores observaram que esse inseto-praga depende de suas bactérias intestinais para o estabelecimento de suas funções imunológicas adequadas e, como as respostas imunes inatas são a única maneira de insetos lutarem contra patógenos, o aproveitamento da capacidade da microbiota intestinal em estimular a imunidade do hospedeiro pode ser considerado uma tática de controle de pragas muito promissora.

Em outro estudo, Kwong et al. (2017) evidenciaram que o sistema imunológico da abelha *Apis mellifera* pode ser estimulado por sua microbiota intestinal nativa. Mais especificamente, *Frischella perrara*, uma bactéria intestinal presente nesta espécie de abelha foi capaz de causar uma forte ativação imunológica e influenciar a imunidade intestinal e a homeostase no piloro (EMERY et al., 2017), tornando evidente que a composição bacteriana intestinal pode determinar o tipo e a robustez das respostas imunes do hospedeiro.

Microrganismos associados a insetos desempenham ainda importante papel na detoxificação de metabólitos secundários produzidos pela planta hospedeira, os quais podem apresentar propriedades antimicrobianas vindo a causar alteração no pH intestinal e a modificar, assim, a composição da microbiota, favorecendo espécies que são capazes de alterar a toxicidade destes compostos (IBANEZ; GALLET; DESPRÉS, 2012; WIELKOPOLAN; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, 2016; BLANTON; PETERSON, 2020). A alteração de metabólitos tóxicos das plantas ingeridas pela microbiota intestinal forma compostos voláteis que são expelidos nas excretas e influenciam o comportamento do hospedeiro, atuando como sinalizadores para outros insetos (RINKE, 2009). A função de detoxificação associada a simbioses também se aplica a xenobióticos (pesticidas) utilizados no controle de insetos (KIKUCHI et al., 2012; ALMEIDA, 2013).

2.5 Fatores que influenciam a microbiota intestinal de insetos

A diversidade da microbiota intestinal está relacionada, em parte, com estruturas especializadas presentes no intestino e com o efeito de pH, condições redox, enzimas digestivas e tipo de alimento ingerido pelo hospedeiro (DILLON; DILLON, 2004). Em geral, insetos que apresentam estruturas mais complexas possuem uma variedade maior de microrganismos, quando comparados com insetos que possuem uma estrutura intestinal mais simples (PERUCHI, 2013). Estudos indicam que as maiores proporções de biomassa microbiana intestinal total em relação a massa do hospedeiro são encontradas em algumas liteiras e comedouros de madeira, incluindo cupins, grilos e baratas (BOZOROV; RASULOV; ZHANG, 2019; WANG et al., 2020).

A maioria das bactérias apresenta um pH ótimo para o crescimento na faixa de 6 - 7, porém existem exceções, como por exemplo bactérias ácido-tolerantes, capazes de criar seu próprio ambiente com pH baixo, através da produção de ácido láctico (VISÔTTO, 2007). Microrganismos aeróbios estritos crescem somente em ambientes com potencial redox positivo, enquanto anaeróbios desenvolvem-se em potencial redox negativo (DILLON; DILLON, 2004).

A composição da microbiota intestinal pode sofrer interferência de vários fatores, incluindo a fase de vida do inseto, as condições bioquímicas nas diferentes regiões intestinais, habitat, dieta, habilidade do inseto em adquirir os recursos disponíveis, dentre outros (WANG et al., 2020).

A diversidade de bactérias tem sido significativamente maior no intestino de insetos caracterizados como onívoros do que em carnívoros ou herbívoros, indicando que a preferência alimentar do hospedeiro é um fator importante na constituição da microbiota intestinal do hospedeiro (WANG et al., 2020). A diversidade da microbiota intestinal também está associada ao habitat do inseto. Devido à diferença dos níveis de oxigênio em diferentes habitats, os aeróbios são mais abundantes no intestino dos insetos terrestres e, de modo contrário, anaeróbios são mais significativos no intestino dos insetos aquáticos (YUN et al., 2014).

Outro achado importante é que a comunidade microbiana intestinal nos insetos varia conforme a fase de vida do hospedeiro (WANG et al., 2020). Nesse seguimento, Anderson et al. (2018) observaram que as populações de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* diminuíram significativamente à medida que abelhas melíferas (*Apis*

mellifera) envelheciam, enquanto bactérias do filo Proteobacteria aumentavam, representando um marcador de senescência do hospedeiro. No estudo supracitado, observou-se também que junto com o aumento do dano oxidativo, as bactérias gram-positivas diminuíaam nas abelhas operárias e aumentavam na rainha.

Em outro estudo, Clark et al. (2015) avaliaram as mudanças relacionadas à idade na composição da microbiota intestinal de *Drosophila*, revelando um aumento na abundância relativa de Proteobacteria e uma diminuição na proporção de Firmicutes quando os insetos se tornavam mais velhos, o que evidencia que alterações na dinâmica da microbiota podem contribuir e também prever taxas variáveis de declínio da saúde durante o envelhecimento de insetos.

A variação da comunidade microbiana intestinal também está ligada à instabilidade de saúde e aptidão do hospedeiro (KHAN et al., 2020). Nesse sentido, uma dieta suplementada com bactérias probióticas pode aumentar notavelmente a resistência a doenças, elevando a imunidade do inseto e regulando a microbiota intestinal (LEE; CHUREY; WOROBO, 2009).

2.6 Métodos para explorar a microbiota intestinal

As abordagens para determinação taxonômica de microrganismos do microbioma intestinal de insetos variam a depender da fonte de amostras microbianas, sendo, tais abordagens, classificadas em ensaios dependentes de cultura (métodos convencionais de identificação) ou independentes de cultura, os quais abordam especialmente técnicas moleculares (ROMERO et al., 2019).

2.6.1 Ensaios dependentes de cultura

Os ensaios dependentes de cultura são focados no favorecimento da produção de metabólitos dos microrganismos estudados, que podem ser usados para posterior caracterização dos mesmos (WANG et al., 2020). Esse método envolve o isolamento, classificação e enumeração dos microrganismos por métodos microbiológicos convencionais, baseando-se em aspectos morfológicos e bioquímicos. Por essa técnica, grupos bacterianos particulares são estudados após a incubação em ambientes adequados como tipo de meio (seletivo ou não seletivo), temperatura,

atmosfera (anaeróbio ou aeróbio) e algumas outras variáveis que afetam o crescimento microbiano (KHAN et al., 2020).

Como vantagens, esses métodos proporcionam a disponibilidade de culturas puras de bactérias e fungos, capacidade de estudar microrganismos vivos para funções específicas e a detecção de patógenos intestinais exclusivos (SARANGI et al., 2019). Por outro lado, algumas desvantagens também são observadas. De acordo com estimativas, menos de um por cento das bactérias encontradas na natureza podem ser cultivadas por métodos convencionais (PALKOVÁ, 2004), além disso, a relação simbiótica entre os microrganismos e seu hospedeiro é difícil de ser estudada (WANG et al., 2020).

Uma alternativa na identificação rápida de microrganismos se dá pelo uso de estudos proteômicos, empregando-se a espectrometria de massa, para caracterização dos microrganismos alvos. A técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo - TOF (Time-of-Flight), permite a comparação do espectro de massa de um microrganismo isolado com os espectros de referência de cepas conhecidas, presentes em um banco de dados, possibilitando a classificação e identificação de um determinado microrganismo com mais rapidez do que os métodos convencionais, constituindo um método promissor na caracterização de microrganismos, com alta confiabilidade (BIER et al., 2017).

2.6.2 Ensaio independentes de cultura

Métodos independentes de cultura são amplamente recomendados para a determinação do perfil taxonômico inicial de comunidades microbianas, pela dificuldade de cultivo de muitos microrganismos por técnicas tradicionais. O progresso desses métodos tem permitido a identificação e caracterização de vários filotipos microbianos (WANG et al., 2020).

Os principais ensaios independentes de cultura incluem o PCR quantitativo (qPCR) em tempo real, hibridização *in situ* fluorescente (FISH), citometria de fluxo e sequenciamento de DNA por meio de metatranscriptômica e metagenômica (JANDA; ABBOTT, 2007; KHAN et al., 2020).

Entre os métodos baseados em PCR, o qPCR é uma abordagem representativa importante. Por exemplo, o uso de *primers* de PCR direcionados aos genes 16S rRNA da microbiota intestinal é capaz de amplificar sequências desse gene presente em todas as bactérias intestinais. Associando os resultados com as etapas de quantificação subsequentes, utilizando fluoróforos ou corantes de ligação de DNA, a composição da microbiota intestinal pode ser identificada (ROUZÉ et al., 2019).

Métodos como FISH e citometria de fluxo também são aplicados na identificação da diversidade microbiana em insetos. As sondas oligonucleotídicas marcadas com fluoresceína direcionadas aos genes 16S rRNA são frequentemente utilizadas para a análise de FISH (PALMA et al., 2009). Por meio de hibridização, as células bacterianas associadas aos tecidos intestinais ou fezes são marcadas com uma sonda fluorescente e podem ser analisadas por citometria de fluxo (WANG et al., 2020).

Mais recentemente, o uso de sequenciamento de última geração em pesquisas biológicas tem se tornado uma técnica muito útil na caracterização da microbiota intestinal em insetos com base em sua alta eficiência e precisão, sendo amplamente aplicado em metatranscriptômica e metagenômica (NI; TOKUDA, 2013).

A análise da diversidade por meio de estudos metagenômicos pode fornecer informações acerca da microbiota de insetos, dada a complexidade de microrganismos endossimbiontes em sua grande maioria não cultivável. Além disso, essa técnica permite a exploração de funções potenciais de microrganismos específicos dentro das comunidades e são importantes na investigação de metabólitos-chave associados à interação hospedeiro-microbiota intestinal, tornando possível o conhecimento da função desempenhada pelos microrganismos nos processos de digestão e absorção de nutrientes, essenciais à sobrevivência do inseto. (SLEATOR; SHORTALL; HILL, 2008; CHEN et al., 2019; KHAN et al., 2020).

2.7 Celulases e microbiota intestinal de insetos

Há um interesse crescente no desenvolvimento de biomoléculas com aplicações tanto em processos industriais como em pesquisas científicas. As enzimas de interesse biotecnológico podem ser extraídas de diversas fontes, incluindo microrganismos, plantas ou tecidos animais (KTARI et al., 2012; SILVA et al., 2018). Contudo, algumas fontes de enzimas podem aumentar significativamente o custo do

processamento devido à dificuldade em sua obtenção. Diante disso, fontes enzimáticas de fácil aquisição, com custo reduzido e potencial biotecnológico são essencialmente importantes para a sua comercialização.

O recente aumento de estudos abordando aspectos bioquímicos dos insetos se deve a dois motivos principais: o primeiro deles reside no fato de que os insetos fornecem um excelente modelo de estudo para enzimas digestivas, principalmente porque esses animais estão adaptados a quase todos os tipos de habitats e hábitos alimentares. O segundo se dá pela compreensão de que o trato digestivo é a principal interface entre o inseto e seu ambiente (PINTO, 2019).

A celulose é um polissacarídeo que constitui a maior fração da biomassa de plantas, sendo considerada o biopolímero mais abundante na natureza. Em vista disso, este carboidrato se tornou uma importante fonte geradora de combustível sustentável (YAPI et al., 2009). A celulose é constituída por monômeros de glicose, que se ligam pelas pontas e formam um hemopolissacarídeo. Sua estrutura é caracterizada pela união de moléculas de β -glicose por meio de ligações β -1,4-glicosídicas gerando cadeias longas e lineares (RINKE, 2009).

As celulasas, enzimas que hidrolisam celulose, dividem-se em 3 grupos principais com diferentes especificidades: $\text{exo-}\beta$ -1,4-glicanases (celobiohidrolases ou exoglucanases), $\text{endo-}\beta$ -1,4-glicanases (endoglucanases) e β -1,4-glicosidases (β -glucosidases). As $\text{exo-}\beta$ -1,4-glicanases são responsáveis por clivar unidades de celobiose nas cadeias finais não redutoras presentes na celulose cristalina, as $\text{endo-}\beta$ -1,4-glicanases clivam aleatoriamente ligações β -1,4-glicosídicas presentes nas cadeias de celulose e as β -1,4-glicosidases atuam hidrolisando celobiose e pequenas oligocelodextrinas em glicose (VISÔTTO, 2007).

Estudos sugerem que a presença de celulasas no trato intestinal de insetos derivadas da microbiota intestinal aumenta a eficiência da digestão e isso estaria relacionado com a presença de fungos e/ou bactérias capazes de degradar celulose (RINKE, 2009). Apesar de genes que codificam celulasas terem sido encontrados no genoma de determinados insetos, algumas dessas enzimas são exclusivas de microrganismos e desempenham papel fundamental na degradação de metabólitos vegetais, atuando sinergicamente (WARNECKE et al., 2007; TOKUDA et al., 2018; PRZEMIENIECKI et al., 2020).

As comunidades bacterianas intestinais mais comumente estudadas em insetos pertencem aqueles que se alimentam de madeira, matéria em decomposição

ou detritos, como cupins, baratas, grilos e alguns besouros (VOIROL et al., 2018). Insetos que se alimentam de madeira geralmente possuem bactérias intestinais com capacidade de digestão da celulose (WANG et al., 2020). Por exemplo, *Bombyx mori*, que se alimenta de folhas de amoreira, depende principalmente das enzimas digestivas produzidas por suas bactérias intestinais para degradar carboidratos, como pectina, xilano, celulose e amido (ANAND et al., 2010). Em condições normais, essas bactérias intestinais fornecem enzimas digestivas de forma sinérgica e contribuem para o crescimento larval. Casos semelhantes existem em insetos fitófagos e xilófagos, que são os ecossistemas mais eficientes para degradar a celulose (WANG et al., 2020).

R. palmarum é reconhecido por se alimentar exclusivamente de tecido vegetativo vivo do tronco das palmeiras, muitas vezes destruindo a área de crescimento apical e causando a morte da planta e, por essa razão, acredita-se que este inseto possui um sistema enzimático que lhe permite hidrolisar polissacarídeos, como a celulose, que é o principal constituinte da parede das células vegetais (BÉDIKOU et al., 2010). De acordo com as estratégias utilizadas para o levantamento deste estudo, não foram encontradas publicações abordando ensaios de atividade celulolítica com a referida espécie, entretanto Muhammad et al. (2017) determinaram potenciais papéis fisiológicos de microrganismos isolados do intestino de larvas de *R. ferrugineus* capturados na natureza e isolaram sete espécies bacterianas dos gêneros *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* com capacidade de degradação da celulose, sugerindo que o intestino de insetos desse gênero pode abrigar microrganismos com capacidade de degradar polissacarídeos vegetais, os quais podem ser úteis em aplicações biotecnológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a microbiota intestinal cultivável de *R. palmarum* L. e determinar a atividade celulolítica dos isolados, visando a exploração de novas formas de controle biológico.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os microrganismos cultiváveis do trato intestinal de insetos adultos (machos e fêmeas) de *R. palmarum* por meio de MALDI-TOF/MS;
- Verificar a capacidade dos microrganismos isolados da microbiota intestinal de *R. palmarum* em degradar substratos celulósicos;
- Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das bactérias e fungos identificados do trato intestinal de *R. palmarum*;
- Verificar se os insetos capturados são carreadores do fungo *T. paradoxa* em sua carapaça e em seu tubo digestivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Captura de *R. palmarum* e manutenção em laboratório

Insetos adultos de *R. palmarum* foram capturados em campo nas imediações da Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Maceió, AL (Latitude 9°33'22"S e Longitude 35°46'35"W), utilizando-se armadilhas iscadas com feromônio de agregação Rincoforol® associado a pedaços de cana-de-açúcar, conforme descritas por Duarte et al. (2003). Os insetos capturados foram mantidos em gaiolas de plástico com 30 cm³, alimentados com cana-de-açúcar e dispostos em sala climatizada à temperatura ambiente e umidade relativa de 60 ± 10% por até uma semana. O alimento foi trocado a cada dois dias.

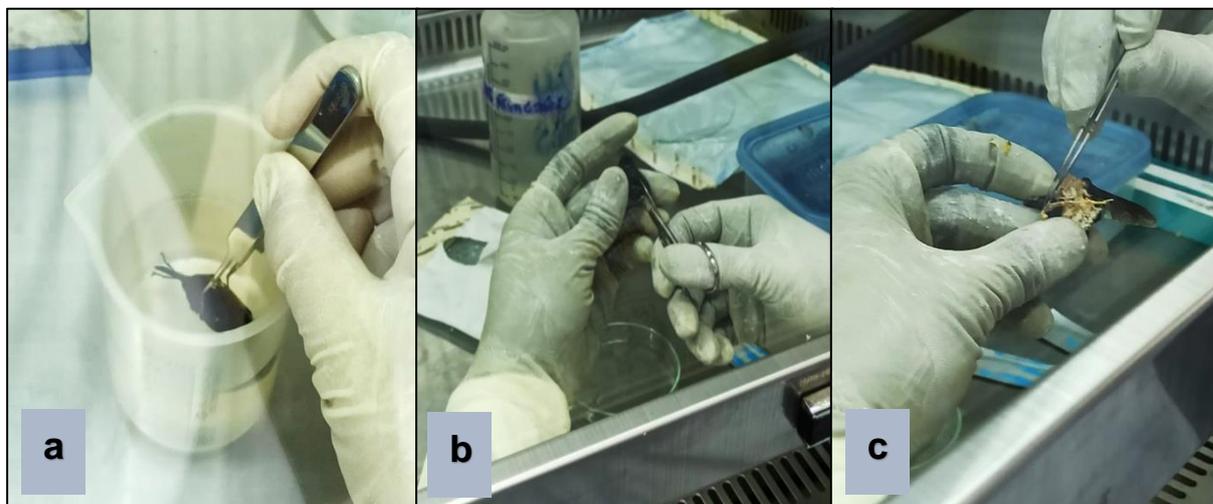
4.2 Isolamento de microrganismos cultiváveis do trato digestivo de *R. palmarum*

4.2.1 Extração intestinal

A dissecação intestinal dos insetos baseou-se na metodologia proposta por Rinke (2009) e Tagliavia et al. (2014), com algumas adaptações. Foram selecionados oito insetos adultos, quatro machos e quatro fêmeas, para realização dos experimentos. Antes da dissecação, os élitros e asas membranosas foram removidos e, em seguida, os insetos foram desinfetados superficialmente pela imersão em hipoclorito de sódio (2%) por 30s, seguido por três enxagues em água destilada esterilizada (figura 8a).

Em câmara de fluxo laminar, dissecações intestinais foram conduzidas em uma placa de Petri estéril (90 x 15 mm de diâmetro). O conteúdo interno (intestino, anexos e corpo gorduroso) foi separado da carcaça com o auxílio de pinças de dissecação fina e agulhas (figura 8b e 8c). O intestino total de cada inseto adulto foi inserido individualmente em tubos de ensaio contendo 2 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e agitados em *vórtex* por 5 minutos a fim de auxiliar a remoção de microrganismos aderidos à parede intestinal. Posteriormente, os tubos foram incubados em estufa microbiológica a ± 35°C durante 24 horas. Transcorrido o período, as amostras foram submetidas à preparação de diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) para posterior plaqueamento nos meios de cultivo selecionados.

Figura 8. Etapas de preparo e dissecação de insetos adultos de *R. palmarum*. (a) desinfecção em hipoclorito de sódio; (b) abertura do corpo do inseto; (c) separação do intestino.



Fonte: Autor, 2021.

4.2.2 Cultivo dos microrganismos

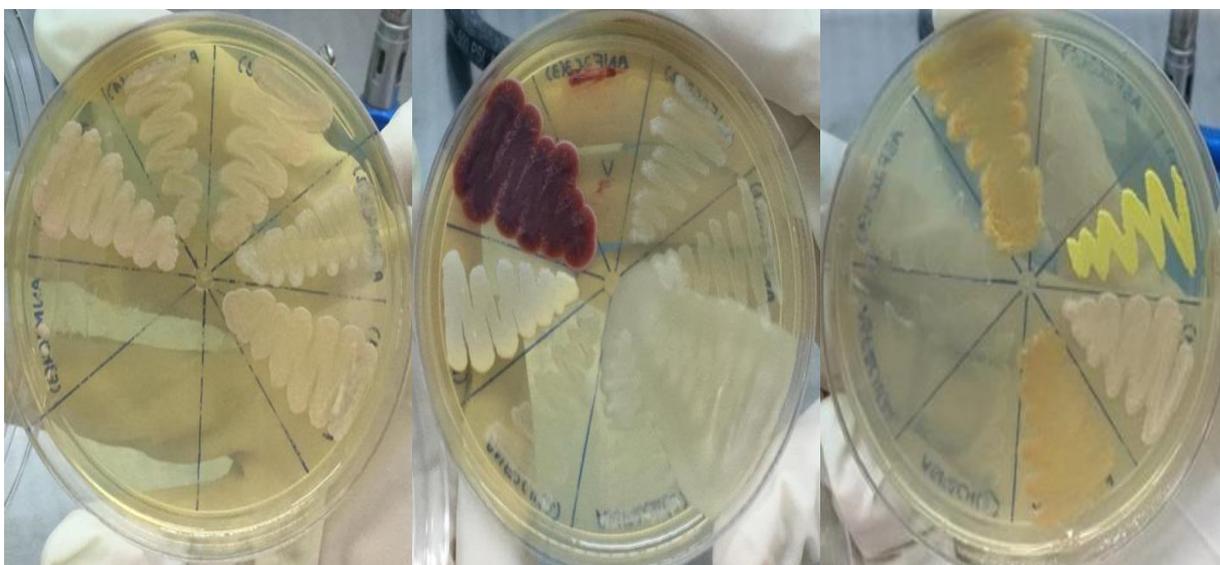
Para obtenção de bactérias aeróbicas, alíquotas de 50 μL das diluições produzidas foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar Sangue (AS), ágar MacConkey (AM) e ágar Nutriente (AN), em duplicata. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 35°C durante 24 horas. Para o isolamento de microrganismos anaeróbicos, foram semeadas alíquotas de 50 μL de cada diluição obtida em placas de Petri contendo ágar Triptona de Soja (TSA). Posteriormente, estas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose com atmosfera modificada constituída por 10% de dióxido de carbono (CO_2), 80% de nitrogênio (N_2) e 10% de oxigênio (O_2) e incubadas por 48 horas em estufa bacteriológica a 35°C.

Fungos leveduriformes e filamentosos foram obtidos através do plaqueamento de alíquotas (50 μL) das diluições em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ \text{C}$) por 1 a 7 dias ou até o surgimento de colônias isoladas, a depender da taxa de crescimento dos microrganismos.

4.2.3 Isolamento e caracterização das colônias

Após constatação de crescimento nos meios de cultivo utilizados, as colônias que apresentaram características morfológicas distintas num mesmo meio de cultura foram selecionadas e repicadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH) (figura 9).

Figura 9. Características morfológicas de colônias isoladas do intestino de *R. palmarum*, crescidas em ágar Mueller Hinton.



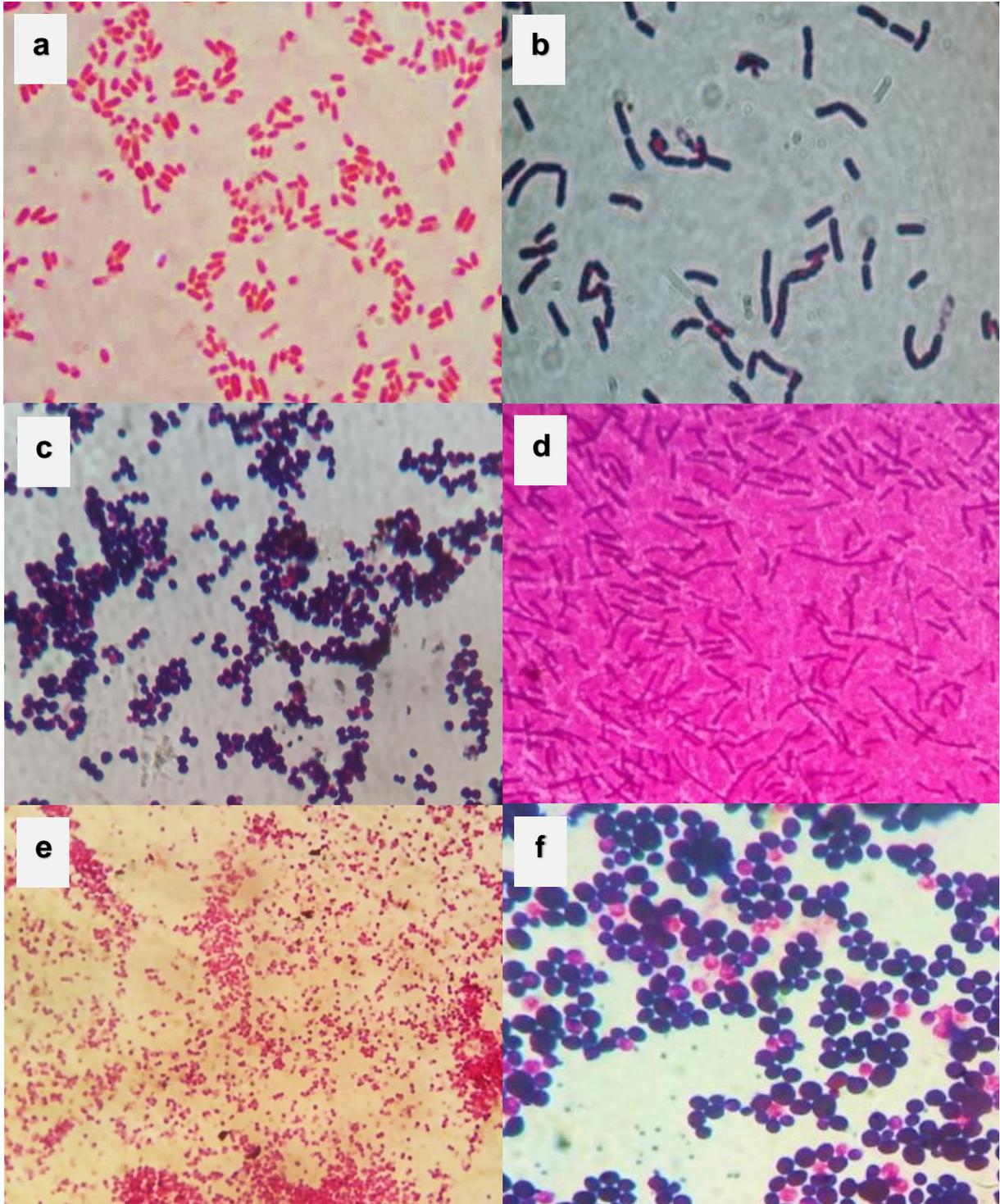
Fonte: Autor, 2021.

A coloração de Gram foi utilizada para classificar bactérias com base nas características morfotintoriais e diferenciar colônias bacterianas de leveduriformes. Após o procedimento de coloração, as lâminas foram examinadas em microscópio ótico (objetiva de 100x), utilizando-se óleo de imersão (figura 10).

Os microrganismos obtidos foram caracterizados presuntivamente por meio de ensaios fenotípicos, tais como prova de catalase, DNase, coagulase, bile esculina, crescimento em NaCl a 6,5%, oxidase, fermentação de açúcares, dentre outros (MURRAY et al., 2017).

Para conservação, os isolados foram cultivados em caldo BHI a 35°C, sendo uma alíquota das células preservada em glicerol a 50% e armazenadas em congelador a - 20°C para análises posteriores.

Figura 10. Morfologia bacteriana e fúngica por meio de coloração de Gram de alguns isolados representativos do intestino de *R. palmarum*. (a) cocobacilos Gram-negativos; (b) bacilos Gram-positivos; (c) cocos Gram-positivos; (d) bacilos Gram-positivos; (e) cocos Gram-negativos; (f) leveduras.



Fonte: Autor, 2021.

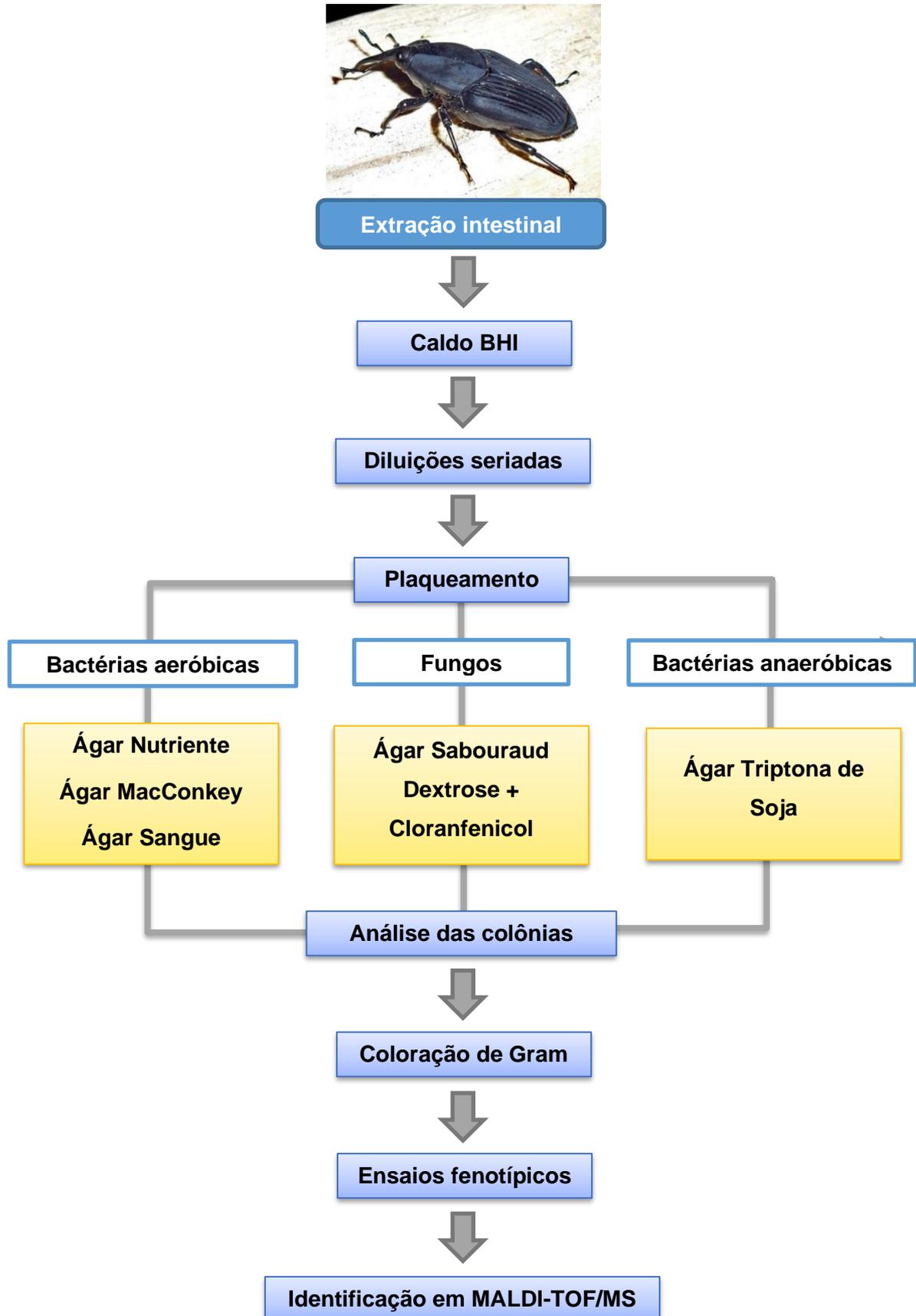
4.3 Identificação dos isolados por espectrometria de massa MALDI-TOF

Com base na morfologia, coloração de Gram e ensaios fenotípicos presuntivos, 147 colônias representativas dos diferentes morfotipos identificados foram colhidas a partir dos meios de cultivo utilizados.

A identificação dos microrganismos foi realizada através de ionização por dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF), acoplado a espectrofotômetro de massas da marca Microflex™ (Bruker Daltonik) pertencente à Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Uma alíquota de 1 mL dos cultivos bacterianos ou fúngicos foram submetidos à extração de proteína total e armazenados a -20°C até a análise. Para leitura, 1 µL de suspensão proteica foi transferido para uma placa de aço inox de 360 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 µL da matriz (ácido α -ciano-4-hidróxido-cinamico). Cada estirpe foi distribuída em três poços (triplicata) e para cada placa foram realizadas duas leituras, totalizando a captura de seis espectros proteicos por isolado. A detecção dos espectros foi obtida por meio do programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação do agente pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada isolado com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos específicos por gênero e espécie bacteriana ou fúngica, obteve-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: uma pontuação de 2.300-3.000 indicou identificação em nível de espécie altamente provável, uma pontuação de 2.000-2.299 indicou uma identificação segura do gênero com provável identificação de espécie, uma pontuação de 1.700-1.999 indicou o provável identificação ao nível de gênero e uma pontuação de <1.700 foi considerada não confiável.

Figura 11. Fluxograma contendo resumo da metodologia para isolamento e identificação de microrganismos cultiváveis do trato intestinal de *R. palmarum*.



4.4 Atividade celulolítica

Todos os microrganismos identificados de cada inseto adulto de *R. palmarum* foram testados quanto à capacidade de degradação de celulose como fonte de carbono. Para avaliação da atividade celulolítica foi utilizado o meio composto por carboximetilcelulose (CMC) (5 g/L), ágar base (20 g/L) e extrato de levedura (3 g/L) (MUHAMMAD et al., 2017). As bactérias isoladas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura com adição de CMC e incubadas a 35°C por 18 horas. As leveduras foram avaliadas no mesmo meio de cultura, porém com adição de cloranfenicol (50 mg/L). Essas placas foram incubadas à temperatura ambiente (\pm 25°C) por até 72 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A capacidade de degradação da celulose foi verificada após a adição de 5 mL de uma solução de vermelho do congo (1 g/L) sobre cada colônia e incubação das placas à temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido o tempo, a solução do corante foi descartada e as placas foram descoradas com uma solução de NaCl 1M até cobrir toda a placa. Após 15 minutos, essa solução foi retirada das placas. A degradação da carboximetilcelulose foi caracterizada pela formação de halos amarelos ao redor das colônias.

As medições dos diâmetros dos halos de hidrólise e da colônia foram realizadas com o auxílio de um paquímetro (mm), colocado no reverso das placas de Petri. A atividade enzimática dos microrganismos em cada substrato foi avaliada por meio do índice de atividade enzimática (IE). O IE é um parâmetro semi-quantitativo comumente utilizado para avaliar a produção de enzimas por microrganismos em meio sólido (MILANO, 2012). A atividade enzimática extracelular foi determinada mediante relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia e expressa como IE (HUANG et al., 2012; DANTUR et al., 2015). Desse modo, quanto maior o índice, mais elevada é a atividade enzimática no meio. Para as avaliações, foram considerados microrganismos produtores de enzimas em meio sólido aqueles com $IE \geq 2.0$, conforme Milano (2012).

4.5 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos

Uma vez que os microrganismos deste estudo são provenientes de insetos encontrados na natureza, não relacionados com ambientes hospitalares, buscou-se

conhecer o perfil de sensibilidade desses isolados, a fim de buscar cepas resistentes e obter uma melhor compreensão da associação exercida por esses simbiossomas e como podem ter se tornado parte da microbiota destes animais. O perfil de sensibilidade foi determinado para os cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e leveduras identificadas do intestino de *R. palmarum*, por meio dos métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo, segundo as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI-M100, M07-A10, M44-A2). Esses grupos de microrganismos foram escolhidos por apresentarem uma maior facilidade na aquisição de resistência aos antimicrobianos comerciais e estarem associados com infecções relacionadas à assistência à saúde.

4.5.1 Disco difusão

O teste de disco-difusão seguiu o método de Kirby-Bauer. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se discos de antibióticos e antifúngicos, os quais estão descritos na tabela 1, de acordo com o tipo morfológico do microrganismo e a disponibilidade dos respectivos antimicrobianos em laboratório, seguindo os padrões especificados nos documentos M-100 (CLSI, 2020) e M44-A2 (CLSI, 2018).

Cerca de 20 a 30 minutos antes da realização do ensaio, as placas de Petri contendo os meios de cultura e os frascos com discos de antimicrobianos foram retirados da geladeira para que adquirissem temperatura ambiente.

Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e a suspensão microbiana determinada pela transmitância equivalente à de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Esse procedimento fornece uma suspensão de bactérias contendo cerca de $1,5 \times 10^8$ células/mL e de leveduras entre 1 e 5×10^6 células/mL. Em seguida, *swabs* estéreis foram embebidos nas suspensões e, logo após, semeados de forma suave e homogênea, cobrindo toda a superfície do meio ágar Mueller Hinton (para bactérias) e ágar Sabouraud (para leveduras).

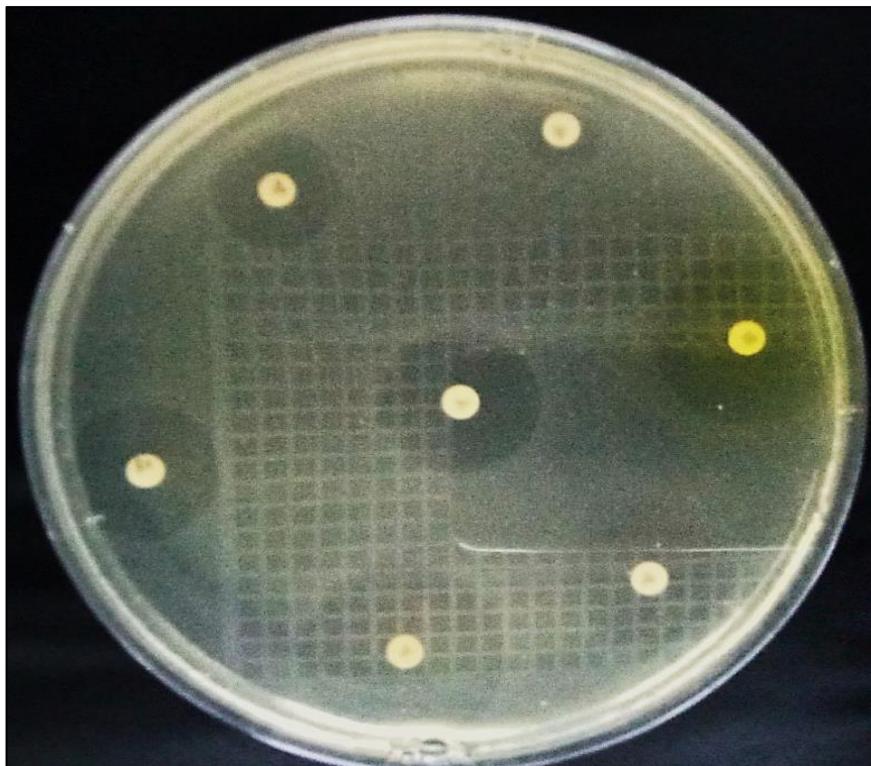
Tabela 1. Antimicrobianos utilizados nos ensaios de disco difusão em ágar e suas respectivas concentrações.

Antimicrobianos	Concentração
Cocos Gram-positivos:	
Penicilina	10 µg
Norfloxacino	10 µg
Ciprofloxacino	5 µg
Vancomicina	30 µg
Tetraciclina	30 µg
Cloranfenicol	30 µg
Gentamicina	10 µg
Nitrofurantoína	300 µg
Sulfametoxazol + Trimetoprima	25 µg
Bacilos Gram-negativos:	
Ampicilina	10 µg
Cefoxitina	30 µg
Ceftriaxona	30 µg
Aztreonam	30 µg
Ácido Nalidíxico	30 µg
Nitrofurantoína	300 µg
Ciprofloxacino	5 µg
Imipenem	10 µg
Gentamicina	10 µg
Tetraciclina	30 µg
Leveduras:	
Fluconazol	25 mg
Nistatina	100 UI

Fonte: Autor, 2021.

As placas semeadas foram deixadas em repouso por cerca de 5-10 minutos, permitindo a completa absorção do inóculo pela superfície do meio. Transcorrido esse período, os discos de antimicrobianos foram inseridos sobre a superfície do meio inoculado, com auxílio de uma pinça estéril, exercendo uma leve pressão com a ponta da mesma para uma boa adesão dos discos. Após a incubação (35°C x 24 h), o padrão de crescimento foi analisado pela medida, em milímetros (mm), do halo de inibição formado ao redor de cada disco (figura 12), conforme diretrizes do CLSI (2020). Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 90028) foram utilizadas para o controle do experimento.

Figura 12. Ensaio de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão, evidenciando os halos de inibição do crescimento microbiano em cepa controle.



Fonte: Autor, 2021.

4.5.2 Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo foi utilizada para avaliação do perfil de sensibilidade das cepas de *E. faecalis* identificadas neste estudo frente à vancomicina (ABL®) e linezolid (Cristália ®), uma vez que este microrganismo apresenta resistência intrínseca a determinadas classes de antimicrobianos e possui habilidade em adquirir e disseminar genes de resistência com outros patógenos (HAMMERUM, 2012; DUBIN; PAMER, 2014), além de ter sido a espécie de maior ocorrência nas amostras estudadas.

Os antibióticos utilizados foram diluídos em água para injeção estéril, obtendo-se a concentração de $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quanto aos inóculos, estes foram preparados em solução salina tamponada estéril e a suspensão bacteriana determinada pela turvação correspondente a escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ células/mL) e diluída numa proporção de 1:10, para se conseguir uma concentração final de bactérias de 5×10^5 células/mL ao inocular $5 \mu\text{L}$ dessa suspensão em cada poço (CLSI, 2018/M07-A10).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços, com 12 colunas enumeradas de 1-12 e 8 linhas marcadas de A-H. Todos os orifícios da microplaca foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller Hinton (MH). Em paralelo, em todas as colunas da linha A foram desferidas alíquotas de 100 µL dos antibióticos comerciais testados com um volume de 100 µL, preparados na concentração de 1024 µg mL⁻¹. Após esse processo, 100 µL de cada cavidade da linha A foi pipetado e transferido para o poço da linha B da mesma coluna, realizando a homogeneização do conteúdo e, então, 100 µL desse poço foi transferido para a linha C, repetindo-se o processo até a linha H e descartando o excedente. Posteriormente, em cada poço foi adicionado 5 µL do inóculo microbiano, exceto naqueles correspondentes ao controle de esterilidade.

Os controles do experimento foram realizados em uma placa a parte. Para o controle da viabilidade microbiana utilizou-se o caldo de cultivo MH e o inóculo bacteriano. O controle negativo foi realizado com uma solução de água para injeção, empregada para a diluição dos antibióticos, enquanto que para o controle de esterilidade foi utilizado apenas caldo MH, a fim de comprovar a esterilidade do meio e das microplacas utilizados.

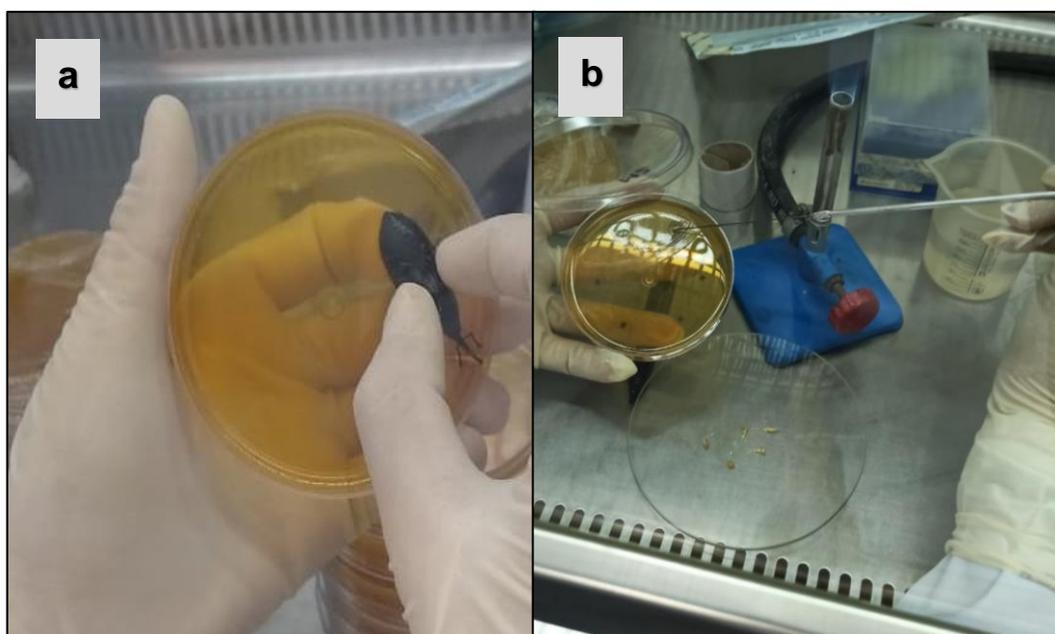
As microplacas foram acondicionadas em estufa microbiológica a 35°C durante 18 a 24 horas. Transcorrido o período de incubação, foi efetuada leitura das placas com auxílio do revelador Cloreto de Trifenil Tetrazólio 2,3,5 (TTC) a 1%, que indica crescimento microbiano. Para isto, foi inoculado 20 µL do revelador (TTC) em todos os poços e, em seguida, as microplacas foram reincubadas por um período de 3 horas. Após este período, as mesmas foram observadas e analisadas. A ausência de cor nos poços foi interpretada como microrganismo sensível ao extrato testado (ausência de crescimento). De modo contrário, os poços que apresentaram coloração avermelhada foram interpretados como microrganismo resistente (presença de crescimento). A CIM foi definida como a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento do microrganismo. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6 Pesquisa de *Thielaviopsis paradoxa*

A metodologia baseou-se no estudo de Costa e Carvalho et al. (2011). Para verificação da presença de *T. paradoxa* na parte externa de *R. palmarum*, 20 insetos adultos capturados em campo foram esfregados um a um em placas de Petri contendo

Ágar Batata Dextrose (BDA) (figura 13a), delimitando-se um inseto por placa. Para avaliação da presença de *T. paradoxa* no tubo digestivo do inseto, os intestinos foram extraídos, conforme descrito no item 4.2.1, seccionados em três partes e inseridos em placas de Petri contendo ágar BDA acrescido de cloranfenicol (50 mg/L) (figura 13b). Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por um período de 5 dias.

Figura 13. Cultura do exoesqueleto (a) e do tubo digestivo de *R. palmarum* (b) para isolamento de *T. paradoxa*.



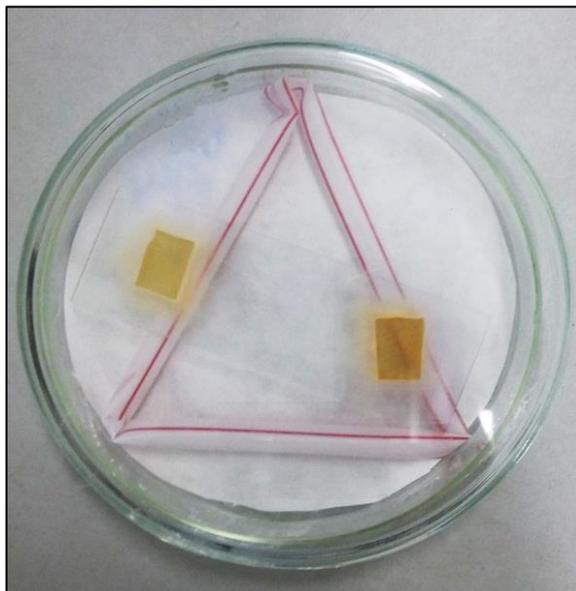
Fonte: Autor, 2021.

Transcorrido o tempo, as placas foram avaliadas quanto à presença de crescimento fúngico. Os fungos filamentosos que apresentaram crescimento foram submetidos à identificação por meio de estimulação de esporulação pela técnica de microcultivo em lâmina (figura 14), utilizando-se ágar Lactrimel (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2010; ZAITZ et al., 2010).

As colônias que apresentaram macroscopicamente: crescimento radial uniforme, inicialmente hialino, tornando-se totalmente cinza aos 4 dias; e microscopicamente: conidióforos hialinos a marrom pálido de até 250 μm de comprimento, produzidos endogenamente em cadeias, de forma cilíndrica e elipsoidal (7-14 x 2,7-6 μm), com presença de clamidósporos lisos e de parede dupla, localizados nas cadeias terminais, exibindo coloração variando do marrom pálido a

marrom escuro (25/09 x 15/06 mm) foram identificadas presuntivamente como *T. paradoxa*, forma anamorfa do fungo *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau (WARWICK; PASSOS, 2009). A presença de estruturas do fungo em qualquer uma das partes do seu tubo digestivo caracterizou o inseto como infectado.

Figura 14. Microcultivo em lâmina para observação de características microscópicas das colônias fúngicas.



Fonte: Autor, 2021.

4.7 Análise estatística

Os dados foram lançados em planilha do programa GraphPad Prism® 9.0.0 e, após, representados em gráficos e tabelas. A atividade celulolítica dos microrganismos isolados foi avaliada por análise de variância (ANOVA). O nível de significância ao limiar foi estabelecido em 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

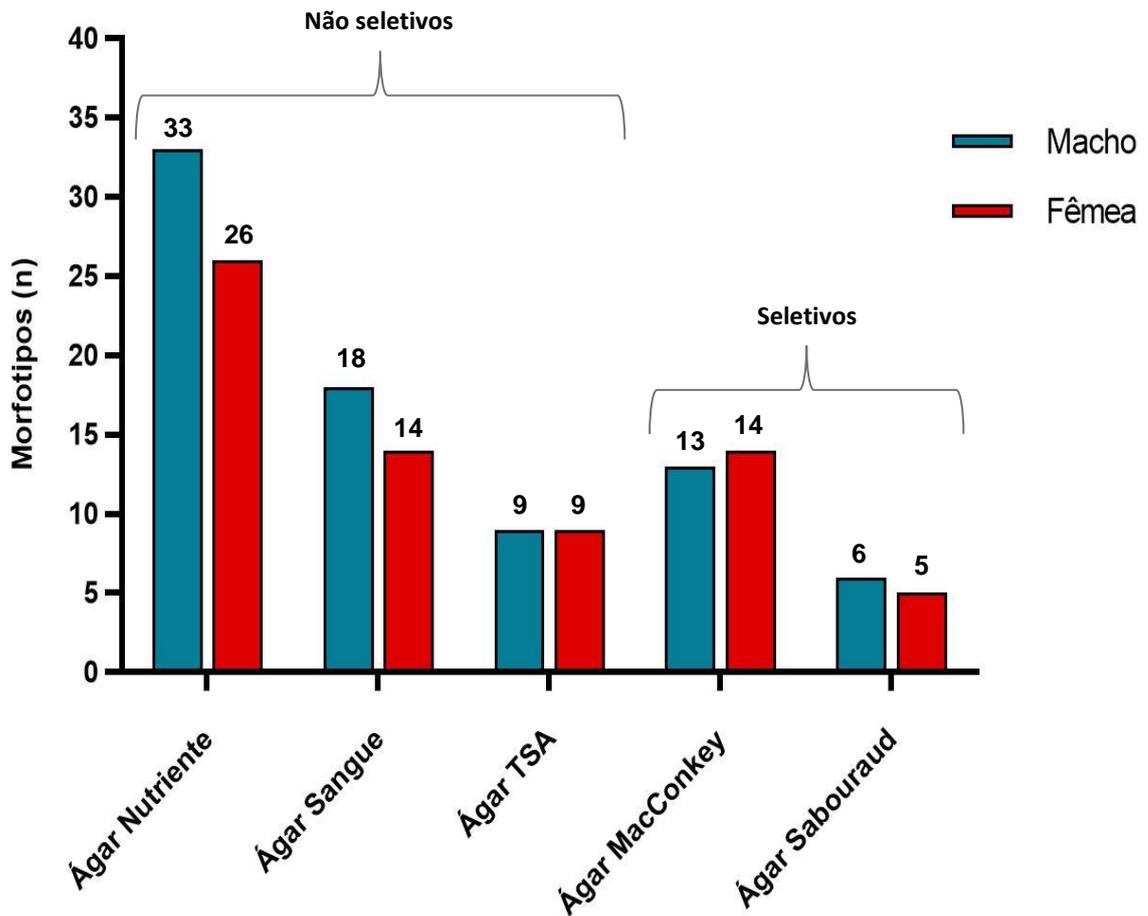
5.1 Microbiota cultivável associada ao trato intestinal de *R. palmarum*

Os meios de cultura utilizados propiciaram o isolamento de bactérias e fungos associados ao intestino de insetos adultos de *R. palmarum*, permitindo a seleção de 147 morfotipos com base em suas características morfológicas, coloração de Gram e ensaios fenotípicos presuntivos, dos quais 136 corresponderam a morfotipos bacterianos e 11 a fúngicos. Além disso, do total de morfotipos obtidos, 79 (53,7%) foram provenientes do intestino de machos e 68 (46,3%) de fêmeas.

Os morfotipos obtidos em cada meio de cultura, conforme o sexo do inseto, estão apresentados na figura 15. Entre os meios não seletivos, ágar nutriente contribuiu com 40,1% de toda diversidade morfológica avaliada, representando um total de 59 morfotipos, 33 provenientes do intestino de machos e 26 de fêmeas, seguido por ágar Sangue com 21,8% dos morfotipos obtidos. De modo contrário, o ágar TSA, embora utilizado para cultivar uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias anaeróbias, aeróbias e leveduras, apresentou a menor quantidade de morfotipos distintos entre os meios não seletivos. O ágar MacConkey, por ser seletivo, proporcionou o isolamento apenas de bactérias Gram-negativas, especialmente enterobactérias, enquanto em ágar Sabouraud foi observada a menor quantidade de morfotipos, o que também era esperado, uma vez que este meio é acrescido de antibiótico, inibindo o crescimento de bactérias, além de possuir substratos e condições que favorecem o melhor crescimento de fungos.

É importante ressaltar que os morfotipos obtidos podem não representar fielmente toda a população cultivável, uma vez que essa escolha fenotípica, com base apenas na morfologia, não é precisa. Como os microrganismos foram isolados a partir de meios de cultivo distintos, estes podem representar as mesmas cepas/linhagens e, da mesma forma, morfotipos idênticos podem representar cepas/linhagens diferentes.

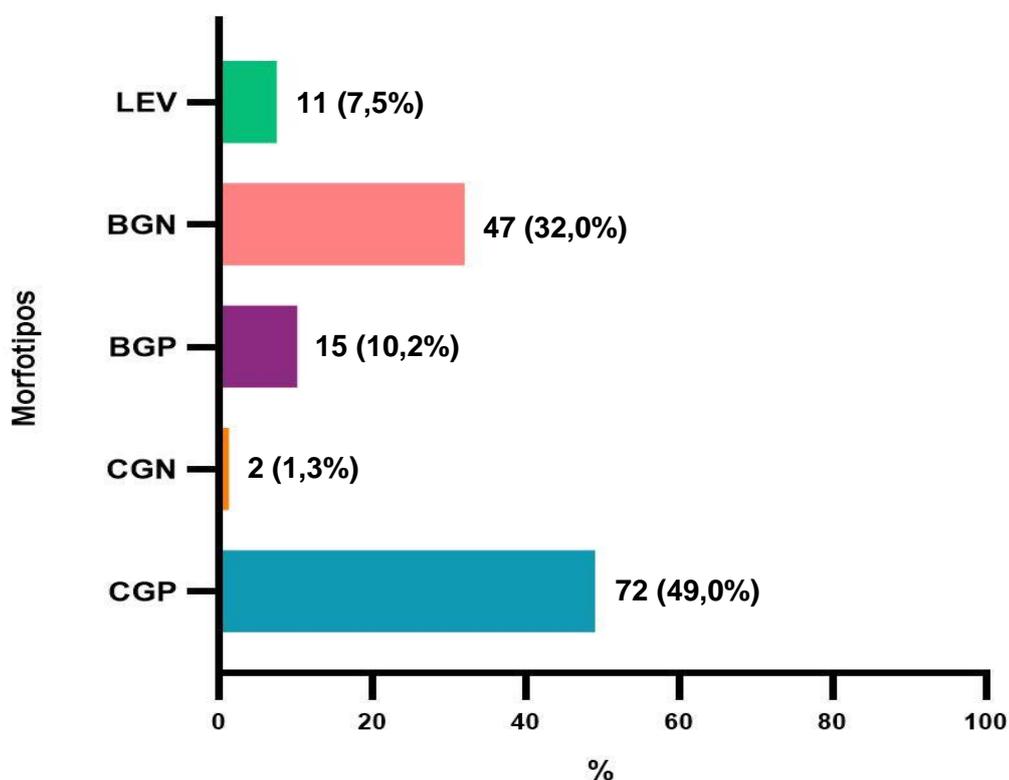
Figura 15. Número de morfotipos obtidos a partir dos meios de cultura utilizados para o isolamento de microrganismos do trato intestinal de *R. palmarum*.



Fonte: Autor, 2021.

Entre os morfotipos isolados, houve um predomínio de bactérias, sendo estas representadas por cocos Gram-positivos (49,0%), bacilos Gram-negativos (32,0%), bacilos Gram-positivos (10,2%) e cocos Gram-negativos (1,3%), enquanto leveduras representaram 7,5% da diversidade morfológica obtida (figura 16).

Figura 16. Tipos morfológicos microbianos isolados do trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum*.

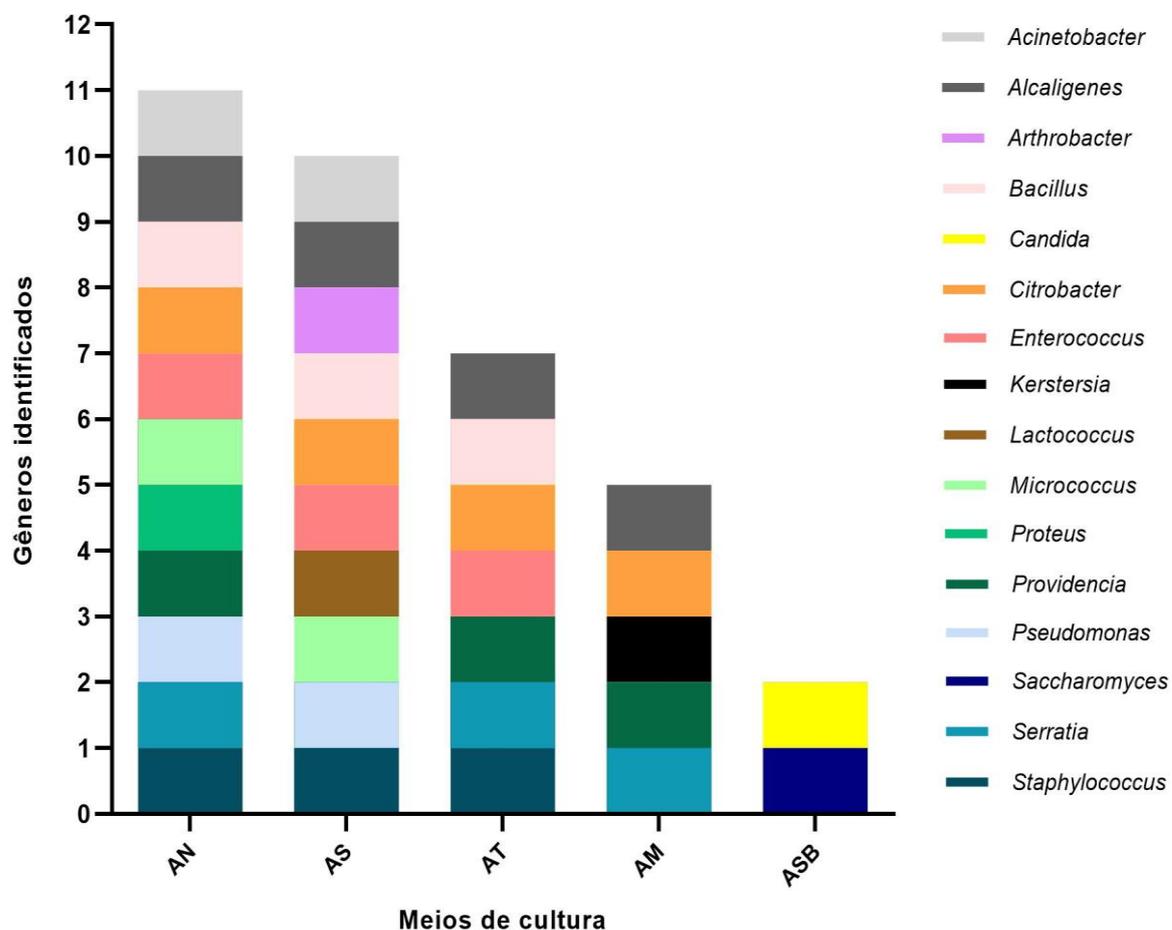


Legenda: CGP = Cocos Gram-positivos; CGN = Cocos Gram-negativos; BGP = Bacilos Gram-positivos; BGN = Bacilos Gram-negativos; LEV = Leveduras.

Fonte: Autor, 2021.

Embora 147 morfotipos tenham sido selecionados, após identificação por MALDI-TOF/MS foi possível observar que essa diversidade morfológica representava uma diversidade filotípica muito menor. Os morfotipos selecionados resultaram na identificação de 20 microrganismos distintos, distribuídos em 14 gêneros bacterianos (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Kerstersia*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Staphylococcus*) e dois gêneros fúngicos (*Candida* e *Saccharomyces*) por meio de MALDI-TOF/MS. Dentre os meios de cultivo utilizados para bactérias, ágar nutriente proporcionou o isolamento de uma maior variedade de gêneros (n=11), seguido por ágar sangue (n=10), ágar triptona de soja (n=7) e ágar MacConkey (n=5). Ágar Sabouraud proporcionou a identificação de 2 gêneros fúngicos, conforme figura 17.

Figura 17. Gêneros bacterianos e fúngicos identificados no trato intestinal de *R. palmarum* por MALDI-TOF/MS, utilizando-se diferentes meios de cultura.



Legenda: AN = Ágar Nutriente; AS = Ágar Sangue; AT = Ágar Triptona de Soja; AM = Ágar MacConkey e ASB = Ágar Sabouraud.

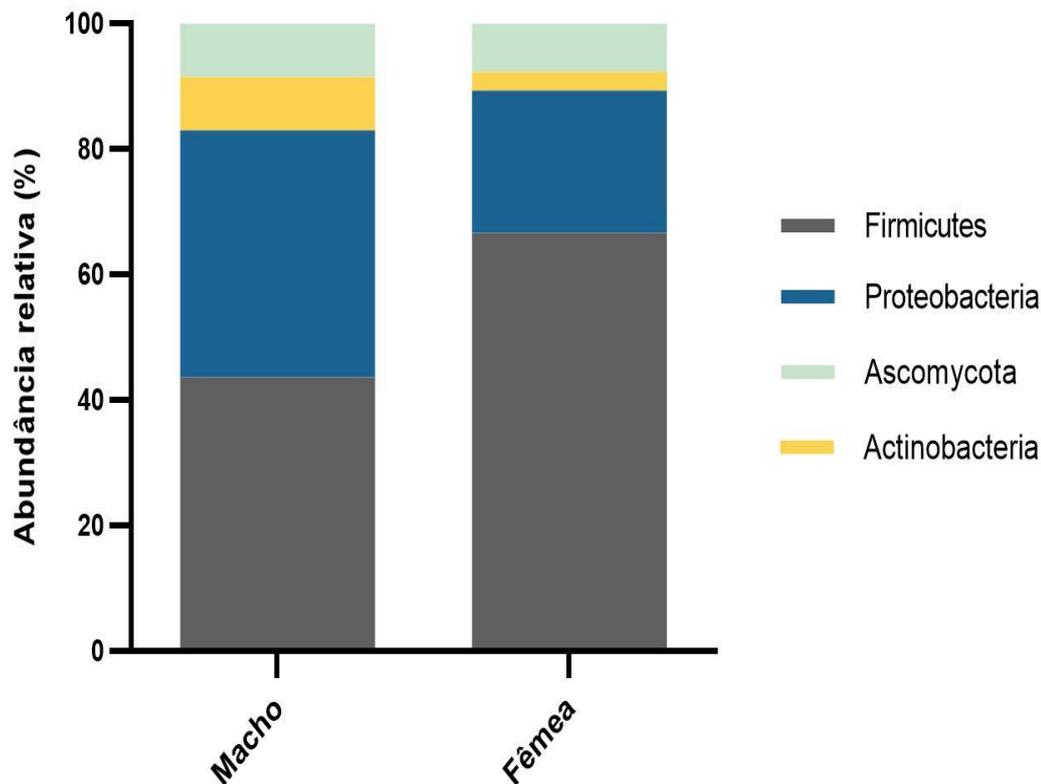
Fonte: Autor, 2021.

Outros estudos também observaram bom desempenho de ágar nutriente no crescimento de microrganismos associados ao trato intestinal de insetos. Müller (2013) realizou caracterização da microbiota intestinal cultivável associada ao trato digestivo de larvas e adultos de *Anastrepha fraterculus* (mosca-das-frutas) e verificou que este meio de cultura proporcionou o isolamento de uma maior diversidade de microrganismos. Em outra pesquisa, Peruchi (2013) caracterizou microrganismos do trato digestivo dos cupins *Armitermes euamignathus* e *Coptotermes gestroi* e observou que, entre os meios não seletivos, o ágar nutriente promoveu o isolamento do maior número de morfotipos para as espécies estudadas, atrás apenas do meio Luria Bertani, não utilizado neste estudo. Como características, ágar nutriente é considerado um meio não seletivo, relativamente simples, muito usado nos

procedimentos em laboratório de Microbiologia, sendo constituído principalmente por extrato de carne e peptona (ANVISA, 2004).

A identificação realizada em MALDI-TOF/MS atribuiu os microrganismos cultiváveis aos Filos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Ascomycota. Actinobacteria e Ascomycota foram representados por uma família cada, enquanto o Filo Firmicutes contou com isolados pertencentes a quatro famílias. Proteobacteria apresentou a maior diversidade de gêneros, sendo representado por cinco famílias distribuídas em duas diferentes classes (β e γ -proteobacteria) (Tabela 2). A distribuição relativa de filios identificados do trato intestinal de *R. palmarum* estão descritas na figura 18. Firmicutes e Proteobacteria foram mais abundantes tanto em machos quanto em fêmeas, representando mais de 85,0% da diversidade microbiana cultivável identificada. No intestino de fêmeas, a proporção de Firmicutes em relação a Proteobacteria foi maior quando comparado ao intestino de machos.

Figura 18. Distribuição relativa (%) dos filios pertencentes aos microrganismos identificados do trato intestinal de *R. palmarum*.



Fonte: Autor, 2021.

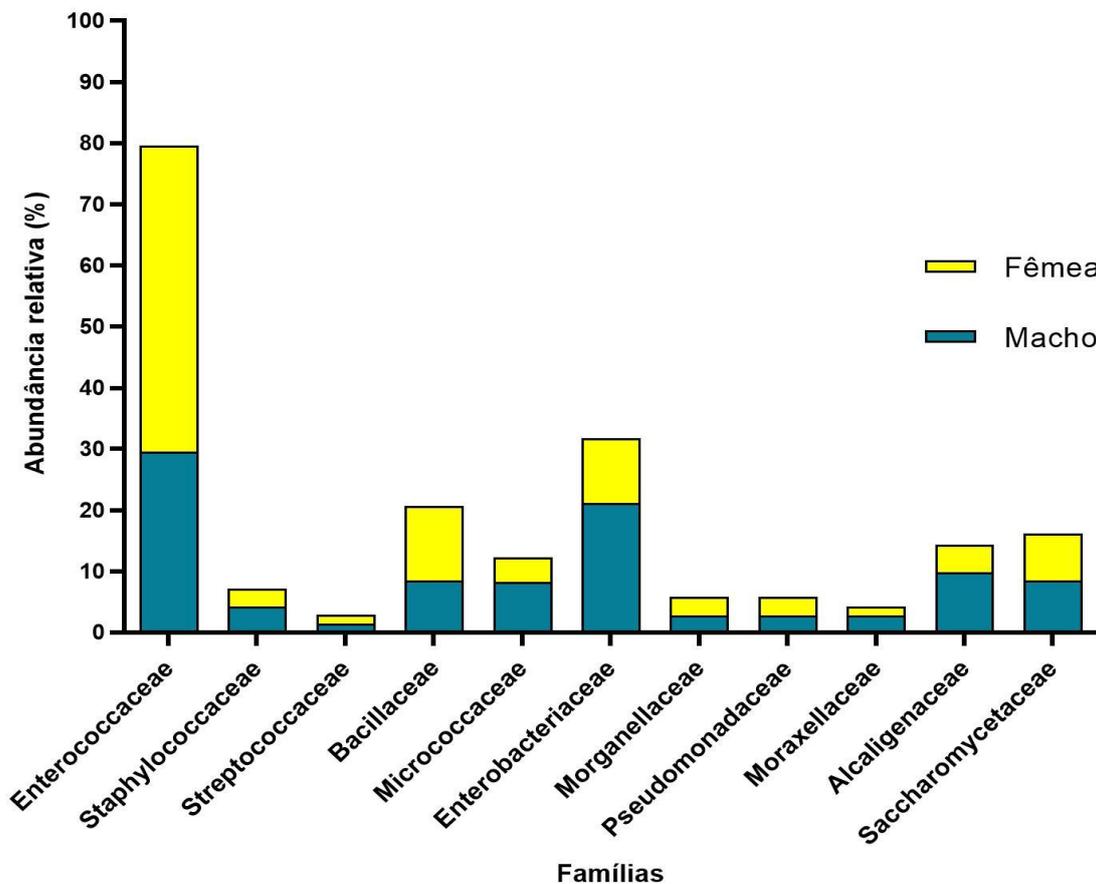
Tabela 2. Descrição filogenética dos isolados bacterianos e fúngicos representativos do intestino de insetos adultos de *R. palmarum*, conforme identificação realizada em MALDI-TOF/MS.

Filo	Classe	Família	Espécie	Número de isolados		Scores	Classificação
				Macho	Fêmea		
Firmicutes	Bacilli	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	20	32	1.978 – 2.308	Facultativo
			<i>Enterococcus raffinosus</i>	1	1	1.908 – 2.005	Facultativo
		Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus cohnii</i>	3	2	1.823 – 2.149	Aeróbio
		Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	1	1	2.122 – 2.230	Facultativo
		Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>	5	7	1.929 – 2.188	Facultativo
			<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	2.083 – 2.111	Aeróbio
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i>	5	2	1.970 – 2.102	Aeróbio
			<i>Arthrobacter</i> sp.	1	-	1.762	Aeróbio
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter koseri</i>	12	3	2.004 – 2.287	Facultativo
			<i>Serratia marcescens</i>	3	2	2.021 – 2.118	Facultativo
		<i>Proteus mirabilis</i>	-	2	2.001 – 2.159	Facultativo	
		Morganellaceae	<i>Providencia rettgeri</i>	2	2	1.926 – 2.129	Facultativo
	Betaproteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.	2	2	1.704 – 1.707	Aeróbio
			Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.	2	1	1.780 – 1.864
		Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes faecalis</i>	7	2	1.920 – 2.108	Aeróbio
			<i>Kerstersia gyiorum</i>	-	1	2.037	Aeróbio
Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetaceae	<i>Candida tropicalis</i>	1	1	2.002 – 2.121	Facultativo
			<i>Candida guilliermondii</i>	1	-	2.008	Facultativo
			<i>Candida</i> sp.	3	3	1.703 – 1.824	Facultativo
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1	2.005 – 2.145	Facultativo

Fonte: Autor, 2021.

Das famílias identificadas, Enterococcaceae foi a mais abundante tanto no intestino de machos (29,6%) quanto em fêmeas (50,0%). Em insetos machos, Enterobacteriaceae foi a segunda mais prevalente (21,2%), seguida por Alcaligenaceae (9,9%) e Bacillaceae (8,5%), enquanto em insetos fêmeas Bacillaceae foi a segunda de maior ocorrência (12,2%), seguida por Enterobacteriaceae (10,6%) e Saccharomycetaceae (7,7%) (figura 19).

Figura 19. Abundância relativa (%) das famílias de microrganismos cultiváveis associadas ao trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum*.

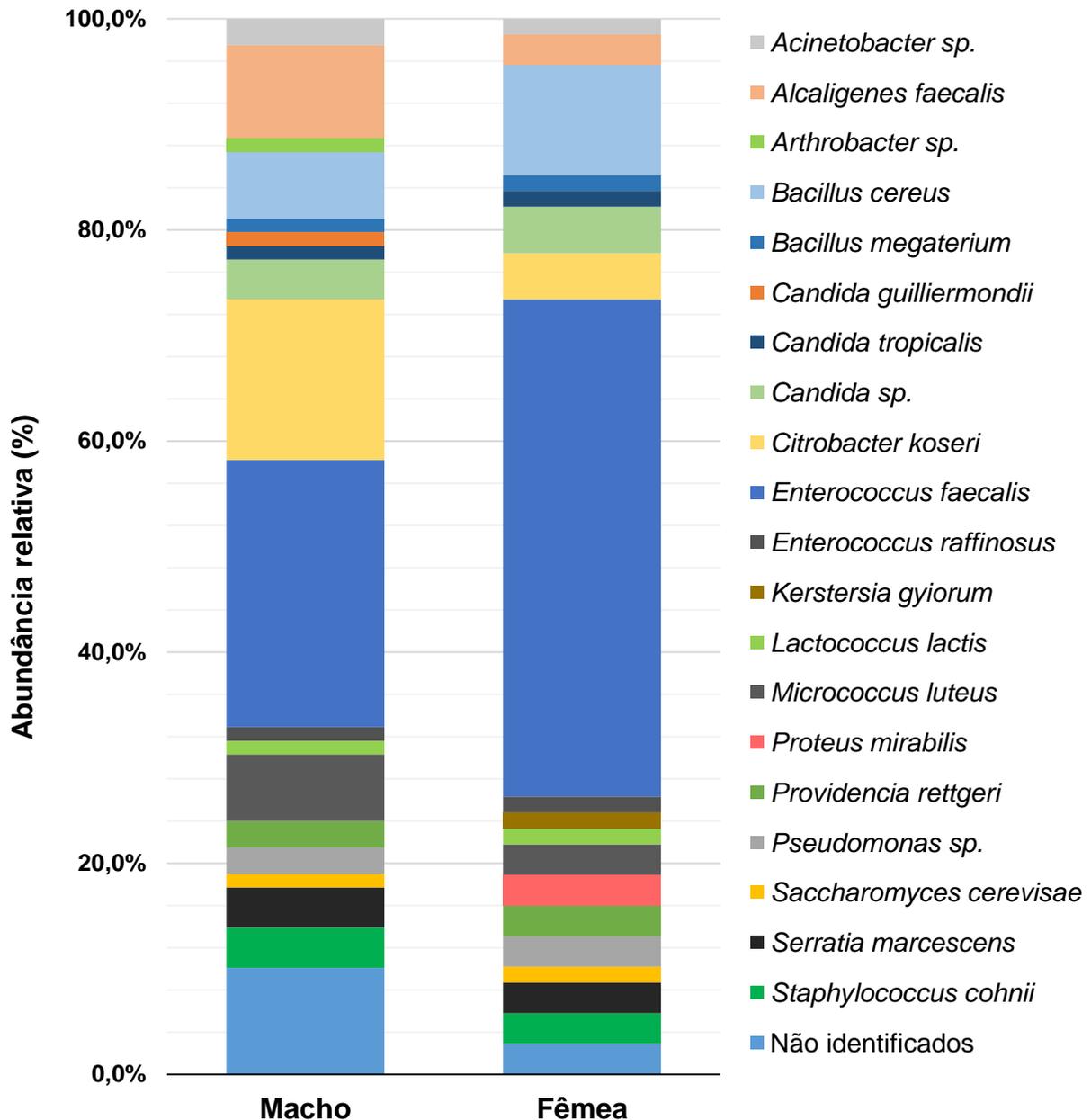


Fonte: Autor, 2021.

Dentre os 20 microrganismos identificados, 16 foram encontrados em ambos os sexos. *Proteus mirabilis* e *Kerstersia gyiorum* foram achados somente no intestino de fêmeas, enquanto *Arthrobacter* sp. e *Candida guilliermondii* foram isolados apenas do intestino de machos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais abundante em insetos machos (25,3%) e fêmeas (47,1%), seguida por *Citrobacter koseri* (15,2%) e *Alcaligenes faecalis* (8,8%) em machos e *Bacillus cereus* (10,4%) e *Citrobacter koseri* (4,4%) em fêmeas (Figura 20). Dez isolados apresentaram escores abaixo de 1.700 e

não puderam ser identificados por meio de MALDI-TOF/MS. Além disso, do total identificado, 8 microrganismos foram classificados como aeróbios e 12 como facultativos, no que se refere à obtenção de energia.

Figura 20. Distribuição relativa (%) de espécies identificadas no trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum*.



Fonte: Autor, 2021.

Nos últimos 10 anos, a diversidade e a composição da microbiota intestinal associada a várias pragas importantes, tais como mosca-da-fruta oriental (*Bactrocera dorsalis* Hendel) (Shi et al., 2012), traça das crucíferas (*Plutella xylostella* L.) (XIA et al., 2018), escaravelho da terebintina vermelha (*Dendroctonus valens* LeConte) (XU

et al., 2018), cupim (*Reticulitermes grassei* Clément) (BERLANGA et al., 2018), gorgulho do pinheiro (*Hylobius abietis* L.) (BERASATEGUI et al., 2016), ácaro (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) (ERBAN et al., 2017), broca do milho (*Busseola fusca* Fuller) (SNYMAN et al., 2016), lagartas (*Helicoverpa armígera* Hübner, *Spodoptera littoralis* Boisd., *Spodoptera exigua* Hübner, *Spodoptera litura* Fabricius e *Spilosoma obliqua* Walker) (TANG et al., 2012; CHEN et al., 2016; BAPATLA et al., 2018; MARTÍNEZ-SOLÍS et al., 2020), gorgulho da camélia (*Curculio chinensis* Chevrolat) (ZHANG et al., 2020), dentre outras, foram investigadas, fornecendo conhecimento acerca do papel dos simbioss em insetos e possibilitando o desenvolvimento de estratégias para o controle dessas pragas.

Sabe-se que os insetos dependem da microbiota intestinal para manutenção de muitas funções biológicas básicas (ENGEL; MORAN, 2013). A complexidade da microbiota difere muito entre as espécies de insetos e entre os indivíduos, sendo esta moldada de acordo com a dieta, habitat e estilo de vida do hospedeiro (WANG et al., 2020).

Até o momento não existem estudos sobre a caracterização da microbiota intestinal de *R. palmarum* por meio de métodos dependentes ou independentes de cultura. No entanto, algumas pesquisas foram desenvolvidas com *Rhynchophorus ferrugineus*, inseto de mesmo gênero e considerado uma praga devastadora em culturas de palmeiras em todo o mundo, especialmente na Ásia (JIA et al., 2013; MUHAMMAD et al., 2019).

Estudos recentes observaram que *R. ferrugineus* apresenta interações mutualísticas facultativas com sua microbiota intestinal, sendo esta responsável pelo desenvolvimento do inseto, desempenhando importante papel no metabolismo nutricional, atuando nos processos de digestão e assimilação de nutrientes (JIA et al., 2013; MONTAGNA et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2017; HABINEZA et al., 2019).

Apesar de diferenças filogenéticas, as espécies mais abundantes isoladas do intestino de *R. palmarum* (*Enterococcus faecalis*, *Citrobacter koseri*, *Bacillus cereus*) são consideradas facultativas e algumas apresentam metabolismo fermentativo, concordante com os resultados observados por Tagliavia et al. (2014), quando analisaram a diversidade da microbiota intestinal de larvas de *R. ferrugineus* capturadas em campo, o que sugere que esses insetos compartilham semelhanças em relação a sua microbiota intestinal, uma vez que estão dispostos no mesmo nicho e apresentam hábitos alimentares parecidos.

Análise metagenômica realizada com 218 espécies de insetos evidenciou Firmicutes como o principal filo identificado no intestino de artrópodes da ordem Coleoptera (Yun et al., 2014). Segundo Tagliavia et al. (2014) e Zhang et al. (2018), Firmicutes e Proteobacteria representam os filios bacterianos predominantes em curculionídeos e, em geral, na maioria dos insetos estudados até o momento, corroborando com os achados encontrados nesta pesquisa.

Diferenças na composição da microbiota intestinal entre machos e fêmeas foram observados em ensaios metagenômicos conduzidos por Sun et al. (2016). Chen et al. (2016) observaram que fêmeas apresentavam maior abundância dos gêneros *Enterococcus*, *Klebsiella* e *Pantoea*, enquanto a microbiota dos machos foi predominantemente composta por *Klebsiella*. Van Schooten et al. (2018) também relataram que as fêmeas em várias espécies de *Heliconius* apresentavam uma concentração maior de Firmicutes que os machos, embora ambos fossem majoritariamente constituídos por Proteobacteria. No presente estudo, embora realizado com métodos dependentes de cultivo, foi observado resultado semelhante, as microbiotas intestinais se mostraram bastante diversificadas com fêmeas colonizadas por uma porcentagem maior do filo Firmicutes e predominância do gênero *Enterococcus*.

O fato de os insetos manterem uma microbiota intestinal estável sugere benefícios potenciais (TANG et al., 2012). Diversas espécies identificadas em *R. palmarum* têm sido documentadas como endossimbiontes em outros insetos, desempenhando múltiplas funções no ciclo de vida destes animais. Curiosamente, muitos microrganismos identificados neste estudo são normalmente encontrados em humanos, animais domésticos e plantas, sugerindo que *R. palmarum* pode mediar as interações entre esses simbiotes e hospedeiros alternativos, servindo como transportadores, vetores e reservatórios para vários microrganismos diferentes. Além disso, como *R. palmarum* possui o hábito de forrageamento (FERREIRA et al., 2014), a exposição a microrganismos ambientais também é esperada.

Enterococcus foi o gênero mais abundante no intestino de *R. palmarum* com base em métodos de cultivo, o que sugere que esta bactéria tem importância funcional para seu hospedeiro. *Enterococcus* é comensal do intestino de humanos e animais (HAMMERUM, 2012), sendo relatada como colonizadora de insetos, como por exemplo em *Spodoptera littoralis* (SHAO et al., 2014; CHEN et al., 2016), *Bombyx mori* L. (SUN et al., 2016; CHEN et al., 2018), *Busseola fusca* Fuller (SNYMAN et al., 2016),

Drosophila melanogaster Meig. (HAN et al., 2017) *Plutella xylostella* L. (XIA et al., 2018), Lepidoptera (VOIROL et al., 2018), *Apis mellifera* L. (ANJUM et al., 2018), *Nezara viridula* L. (MEDINA et al., 2018), *Harmonia axyridis* Pallas (SCHMIDTBERG et al., 2019) e *Triatoma rubrofasciata* De Geer (HU et al., 2020).

Estudos indicam que *Enterococcus* desempenha função importante para o hospedeiro, protegendo da invasão por patógenos e contribuindo para a resistência a inseticidas (MEDINA et al., 2018). Nesse sentido, Broderick et al. (2003) e (2004) observaram que as larvas de *Lymantria dispar* (mariposa cigana) que eram mais suscetíveis à toxina do *Bacillus thuringiensis* (Bt), possuíam uma população menor de bactérias intestinais, especialmente *Enterococcus faecalis*, levando a uma diminuição no pH do intestino médio. A toxina Bt é utilizada tanto pela indústria biotecnológica na produção de plantas transgênicas resistentes a insetos quanto pela agricultura orgânica, como inseticida natural.

Em outro estudo, Vilanova et al. (2016) descreveram que *Enterococcus* spp. isolado de *Hyles euphorbiae* confere tolerância ao látex natural tóxico e extratos de plantas, atuando também na degradação do inseticida clorpirifós, agrotóxico organofosforado usado no tratamento foliar de diversas plantações. Segundo Xia et al. (2018), uma interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico do inseto pode resultar em maior resistência a inseticidas, desempenhando efeito mutualístico quando o animal é desafiado por toxinas, entretanto, o mecanismo pelo qual essas bactérias conferem resistência aos inseticidas ainda é pouco conhecido.

Membros da família Enterobacteriaceae, como *Citrobacter koseri*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* e *Serratia marcescens* foram identificados neste estudo. Como em outros insetos, estas bactérias podem desempenhar papel relacionado à nutrição, degradação de polímeros vegetais, fermentação de açúcares e fixação de nitrogênio. Bactérias da família Enterobacteriaceae também foram identificadas como simbiontes em *R. ferrugineus*, sendo algumas capazes de fixar nitrogênio, fornecendo-lhe compostos essenciais para a síntese de aminoácidos (TAGLIAVIA et al., 2014).

Citrobacter tem sido comumente relatado por formar associações com uma ampla variedade de insetos, incluindo *R. ferrugineus* (TAGLIAVIA et al., 2014; MUHAMMAD et al., 2017), gorgulho do pinheiro (HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2017) cupins (UPADHYAYA et al., 2012; FONTES-PEREZ et al., 2015), mosca (CHENG et al., 2017) e mariposa (MOTCHA et al., 2018). A ocorrência desta bactéria na microbiota intestinal de insetos de diferentes ordens pode sugerir seu papel geral na

suplementação de suas dietas (MENG et al., 2019). Estudos indicam que *Citrobacter* está associado à fixação de nitrogênio, reciclagem de ácido úrico e degradação de celulose (ADAMS; BOOPATHY, 2005; MENG et al., 2019). Além disso, Cheng et al. (2017) descobriram que cepas dessa bactéria eram capazes de degradar o organofosforado Triclorfon, contribuindo para o desenvolvimento de resistência a inseticidas.

O gênero *Providencia* é documentado como membro da microbiota humana normal e tem sido associado a vários animais (FOTI et al., 2009; JHO et al., 2011). Cepas de *Providencia* também foram observadas em associação com insetos, sendo relatadas em moscas AHMAD et al., 2006; MRAMBA et al., 2006; CHANDLER et al., 2011; CORBY-HARRIS et al., 2007; AHARON et al., 2013) e besouros, como *R. ferrugineus* (TAGLIAVIA et al., 2014). Galac e Lazzaro (2012) descreveram essa bactéria como agente infeccioso de virulência variada para *Drosophila melanogaster* e destacaram seu papel no metabolismo da ramnose.

Proteus tem sido reconhecido por sua capacidade em proteger o inseto da invasão por microrganismos patogênicos (ZHAO et al., 2017). Nesse seguimento, pesquisadores observaram que *P. mirabilis* é mantido em níveis elevados no intestino de larvas de moscas (*Musca domestica* L.) para suprimir o crescimento de *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, dois importantes patógenos de insetos (GREENBERG; KLOWDEN, 1972; ERDMANN, 1987). Além disso, essa bactéria pode produzir voláteis com forte odor que servem como atrativo para oviposição de moscas (MA et al., 2012). Na presente pesquisa, foi observado que muitas bactérias da família Enterobacteriaceae, incluindo *Proteus*, apresentavam capacidade de atração de moscas, as quais costumavam se agrupar próximas as placas contendo as culturas bacterianas, o que pode impulsionar trabalhos futuros sobre a composição química das substâncias produzidas, bem como o desenvolvimento de possíveis inseticidas.

Espécies de *Serratia* e *Lactococcus* são supostamente produtores de metil e metoxipirazinas, compostos heterocíclicos aromáticos contendo nitrogênio, capazes de produzir odores com diversos significados biológicos (SCHMIDTBERG et al., 2019). Além disso, *Lactococcus lactis* é uma bactéria láctica que está envolvida na digestão e fermentação de alguns polímeros de plantas para melhorar a aquisição de nutrição de insetos (ZHOU et al., 2017).

Serratia marcescens possui capacidade de colonizar vários nichos, incluindo o trato digestivo de vários animais, sendo recentemente encontrada em insetos

hematófagos que atuam como vetores de parasitas, como *Anopheles*, *Rhodnius* e *Triatoma* (MOTA et al., 2019; HU et al., 2020). Essa espécie tem sido relatada como simbiote em alguns grupos de insetos (MANZANO-MARÍN et al., 2016), mas em outros, como por exemplo em abelhas, pode atuar como patógeno (RAYMANN et al., 2018). Dentre suas principais funções, destacam-se a proteção contra parasitas e melhoria na aptidão do hospedeiro (MUHAMMAD et al., 2017).

Arthrobacter, *Bacillus* e *Pseudomonas* spp., são reconhecidos por degradar poluentes ambientais como clorofenóis, xenobióticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), p-nitrofenol (PNP) e compostos organofosforados (KALLIMANIS et al. 2009; SAHOO et al., 2011). Ademais, *Pseudomonas* tem sido isolada na maioria dos insetos da ordem Coleoptera, atuando na degradação de celulose e alcaloides, sendo esta última propriedade importante para ações no processo de biorremediação (VILANOVA et al., 2016).

Bacillus e *Enterococcus* são reconhecidos por produzir uma ampla variedade de enzimas digestivas, incluindo α -amilases, xilanases e celulasas (ANAND et al., 2010) e, dessa forma, podem ser responsáveis por aumentar a nutrição de *R. palmarum*, produzindo enzimas fundamentais para a digestão de metabólitos vegetais, como amido, lignina, xilano e celulose.

Outros Firmicutes, tais como os do gênero *Staphylococcus* também foram identificados no trato digestivo de diversos insetos (SUN et al., 2016; ANJUM et al., 2018; MEDINA et al., 2018; SCHMIDTBERG et al., 2019), incluindo *R. ferrugineus* (VALZANO et al., 2012). Entre as Actinobactérias isoladas, *Micrococcus* tem sido comumente encontrada em colmeias de abelhas ao redor do mel (MA et al., 2019). Bactérias do filo Actinobacteria podem ser responsáveis pelo fornecimento de vitaminas do complexo B, enzimas extracelulares, metabólitos secundários e compostos bioativos antimicrobianos para o hospedeiro (ZHAO et al., 2017).

Com relação aos fungos, esses microrganismos constituem importante fonte nutricional para o inseto hospedeiro, sendo encontrados especialmente em associação com coleópteros (LIM et al., 2005; JIA et al., 2013; HU et al., 2015; ZHANG et al., 2018). Fungos leveduriformes presentes na microbiota intestinal de insetos podem atuar em processos digestivos, na desintoxicação ou ainda na produção de feromônios utilizados como semioquímicos (SUH et al., 2003).

Leveduras do gênero *Candida* isoladas do trato intestinal de insetos provenientes de uma área florestal da Tailândia demonstraram produzir xilanases e

celulases, colaborando para a degradação de metabólitos vegetais (THONGEKKAEW et al., 2012). Algumas espécies de *Candida* são capazes também de produzir lipase, enzima responsável por catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, desempenhando um importante papel fisiológico em diversos processos metabólicos (digestão de gordura no trato gastrointestinal, lipólise no tecido adiposo, lipólise de lipoproteínas) na conversão de óleos e gorduras em ácidos graxos livres e acilgliceróis parciais (HU et al., 2015).

Jia et al. (2013) observaram que *Candida tropicalis* foi a levedura mais abundante no intestino de larvas de *R. ferrugineus*, seguida por *Saccharomyces cerevisiae*, coincidindo com o observado nesta pesquisa, onde *Candida* e *Saccharomyces* foram os únicos gêneros fúngicos identificados no trato digestivo de *R. palmarum*.

Recentemente, foi demonstrado que as vespas sociais transportam leveduras, predominantemente *S. cerevisiae*, em seu trato digestivo (STEFANINI et al., 2016; MERIGGI et al., 2019). Em *R. palmarum*, a ocorrência desta levedura pode ser proveniente de sua alimentação, uma vez que *S. cerevisiae* está presente na microbiota da cana-de-açúcar, planta utilizada como fonte de alimento por este inseto.

O intestino de *R. palmarum* representa um nicho novo e interessante para estudos de ecologia microbiana, o que pode contribuir para uma melhor compreensão da função exercida pela microbiota intestinal nos processos metabólicos do animal, úteis para o desenvolvimento de estratégias de controle. Uma boa tática tem por princípio a engenharia genética. Bactérias predominantes em insetos podem ser geneticamente modificadas por meio da inserção de genes que codificam toxinas, como por exemplo o plasmídeo *pBtoxis*, proporcionando novas abordagens para eliminar esta praga das plantações de palmeiras, especialmente do coqueiro, importante fonte econômica para o Nordeste brasileiro (FANG et al., 2011).

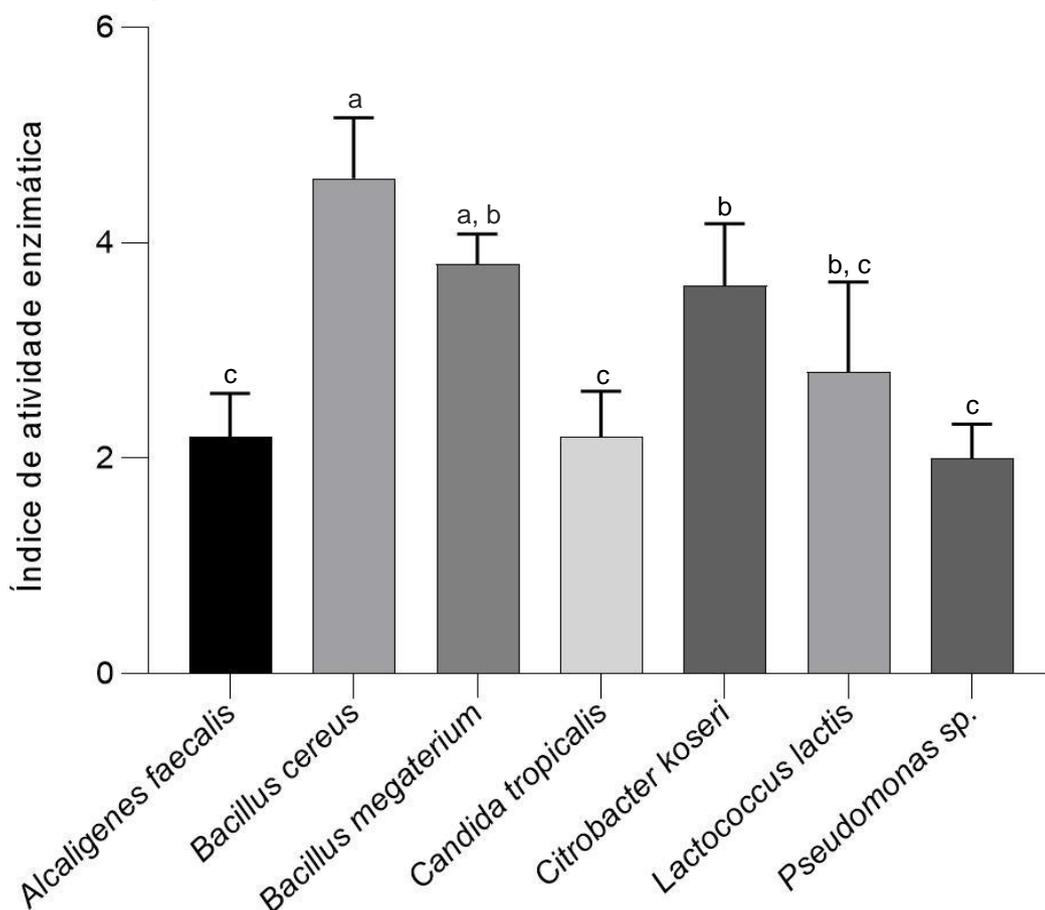
Estudos dependentes de cultivo proporcionam o isolamento de microrganismos viáveis de insetos, sendo úteis na compreensão do potencial fisiológico, metabólico e bioquímico desempenhado por esses simbiontes. Entretanto, embora ensaios dependentes de cultura possam fornecer uma boa indicação da complexidade do ecossistema, este método é limitado a microrganismos cultiváveis nas condições utilizadas e, portanto, não proporciona informações abrangentes sobre a composição das comunidades microbianas (GUPTA et al., 2012; ENGEL; MORAN, 2013). Espera-se com a posterior realização da metagenômica fornecer informações detalhadas

sobre a composição da microbiota intestinal de *R. palmarum* e o papel principal desempenhado por esses microrganismos na fisiologia do inseto.

5.2 Atividade celulolítica

Os ensaios utilizando CMC revelaram que seis espécies bacterianas (*A. faecalis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *C. koseri*, *L. lactis*, *Pseudomonas* sp.) e uma espécie fúngica (*C. tropicalis*) promoveram degradação da celulose. Estas espécies apresentaram atividade celulolítica significativamente variada, pois produziram zonas claras com IE variando de 2,0 a 4,6 ($p < 0,05$). *B. cereus* produziu as maiores zonas de hidrólise (IE = 4,6), seguido por *B. megaterium* (IE = 3,8), *C. koseri* (IE = 3,2) e *L. lactis* (IE = 2,8) (figura 21). Esses achados indicam que o intestino de *R. palmarum* é colonizado por espécies bacterianas e fúngicas com atividade celulolítica.

Figura 21. Atividade celulolítica de espécies bacterianas e fúngicas isoladas do intestino de insetos adultos de *R. palmarum*. As diferentes letras acima do gráfico representam significância estatística ($p < 0,05$).



Microrganismos que degradam celulose têm sido isolados do trato digestivo de insetos que se alimentam de dietas ricas em substratos celulósicos, como por exemplo *Holotrichia parallela* Motschulsky (HUANG et al., 2012; SHENG et al., 2012), *Diatraea saccharalis* Fabr. (DANTUR et al., 2015), *Dendroctonus rhizophagus* Thomas e Bright (MORALES-JIMÉNEZ et al., 2012; BRIONES-ROBLERO et al., 2017), *Lepidiota mansueta* Burmeister (HANDIQUE et al., 2017), *R. ferrugineus* Olivier (MUHAMMAD et al., 2017), *Zyngotoma* (POTHULA et al., 2019), gafanhotos (SU et al., 2014), e principalmente de insetos que comem madeira, como cupins (WENZEL et al., 2002; UPADHYAYA et al., 2012; TSEGAYE et al., 2019) e baratas (GIJZEN et al., 1994). Os resultados obtidos com *R. palmarum* reforçam esses achados, uma vez que esse inseto se alimenta de tecidos ricos em materiais celulósicos, tais como colmos de coqueiro e toletes de cana-de-açúcar.

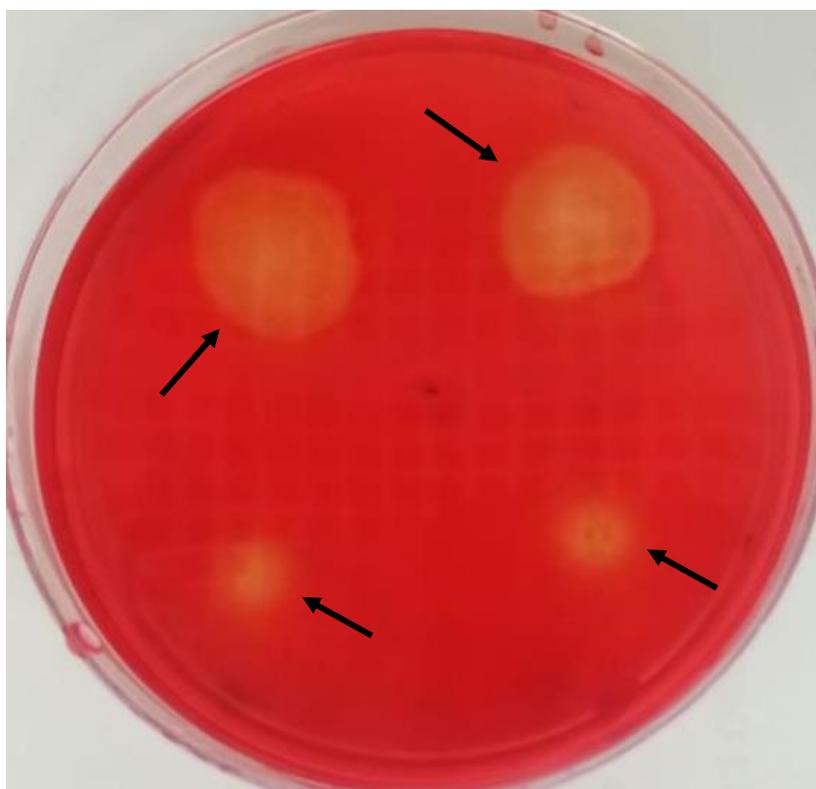
Muitas espécies bacterianas que apresentaram atividade celulolítica foram descritas em outros estudos como degradadoras de compostos celulósicos, em especial as do gênero *Bacillus* e *Citrobacter* (ANAND et al., 2010; MUHAMMAD et al., 2017; GANDOTRA et al., 2018; LUO et al., 2019). Dantur et al. (2015) encontraram alta atividade celulolítica de *Bacillus pumilus* (halos com 7,0 cm de diâmetro) isolado do intestino de larvas de *Diatraea saccharalis* em meio de cultivo sólido utilizando bagaço finamente moído de cana-de-açúcar. Também por meio de método de triagem qualitativo utilizando-se meio sólido, Gandotra et al. (2018) observaram alta capacidade de hidrolisar celulose em nove isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* identificados do intestino do bicho-da-seda (*Antheraea assamensis* Helfer). Em outro estudo, Muhammad et al. (2017) observaram que *C. koseri* isolado do intestino de *R. ferrugineus*, exibiu alta atividade celulolítica, produzindo as maiores zonas de hidrólise (2,0 cm). *E. faecalis*, bactéria identificada em maior número no intestino de *R. palmarum*, não demonstrou atividade celulolítica em meio sólido, indicando que esse microrganismo deve desempenhar outras funções neste inseto, como por exemplo, defesa contra a invasão de patógenos.

Com relação aos fungos isolados no intestino de *R. palmarum*, *C. tropicalis* foi a única espécie que demonstrou atividade celulolítica. Leveduras do gênero *Candida* são reconhecidamente produtoras de celulases, auxiliando na digestão enzimática de celulose em insetos (THONGEKKAEW et al., 2012). Em ensaio experimental, Milano (2012) observou que algumas espécies de *Candida* isoladas do trato intestinal de pragas de cana-de-açúcar (*Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus* e

Diatraea saccharalis) demonstraram atividade enzimática em meio sólido acrescido de carboximetilcelulose, especialmente *C. tropicalis* com IE de 3,6.

O isolamento de microrganismos utilizando meio seletivo contendo CMC como única fonte de carbono é importante para identificar simbiontes que desempenham atividade celulolítica. Nos ensaios em placas de Petri, observou-se a formação de um halo de degradação em torno das colônias (figura 22), resultado da hidrólise de celulose por celulases sintetizadas pelos microrganismos isolados.

Figura 22. Ensaio de atividade celulolítica em ágar CMC corado com vermelho do Congo. As setas indicam degradação enzimática de celulose por meio da formação de halo ao redor das colônias semeadas.



Fonte: Autor, 2021.

A identificação de microrganismos com capacidade em degradar celulose apresenta importância para a indústria biotecnológica, especialmente na produção de bioetanol de segunda geração, produzido a partir de subprodutos lignocelulósicos. Estudos têm demonstrado uma relação entre as atividades de enzimas celulolíticas no intestino de insetos com a composição da biomassa lignocelulósica do alimento consumido por esses animais, sugerindo que estes artrópodes podem carregar microrganismos com capacidade de produzir enzimas altamente eficientes, permitindo

processar rapidamente uma biomassa vegetal específica (CARDOSO et al., 2012; DANTUR et al., 2015).

5.3 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos

Na tabela 3 estão apresentados os perfis de suscetibilidade antimicrobiana dos cocos Gram-positivos isolados do trato intestinal de *R. palmarum*. Todas as cepas demonstraram sensibilidade à vancomicina, ciprofloxacino, cloranfenicol, tetraciclina e nitrofurantoína. Em contrapartida, verificou-se baixa sensibilidade ao aminoglicosídeo gentamicina, especialmente em isolados de *E. faecalis* (30,8%).

As cepas de *E. faecalis* também foram avaliadas quanto à suscetibilidade à vancomicina e linezolida por meio de microdiluição em caldo (tabela 4), não sendo observada resistência a esses antibióticos. A concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% das cepas foi de 2 µg/mL tanto para vancomicina quanto para linezolida.

Com relação aos bacilos Gram-negativos, todas as cepas demonstraram suscetibilidade a ceftriaxona, ciprofloxacino, gentamicina e imipenem. Por outro lado, esses microrganismos se mostraram resistentes à ampicilina. Foram observadas resistências pontuais de algumas espécies a determinados antimicrobianos. *P. mirabilis* e *Pseudomonas* sp. apresentaram alta resistência a nitrofurantoína e tetraciclina, enquanto *Serratia marcescens* demonstrou baixa sensibilidade ao aztreonam e ácido nalidíxico (40,0%) (tabela 5). Todas as espécies de fungos leveduriformes isolados foram sensíveis ao fluconazol e nistatina, conforme tabela 6.

A baixa sensibilidade ao aminoglicosídeo gentamicina pelos cocos Gram-positivos isolados pode ser decorrente da produção de enzimas modificadoras desse antibiótico, tais como 6'-acetil transferase e 2'-fosfotransferase, geralmente expressas por genes localizados em plasmídeos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010), enquanto a reduzida sensibilidade à penicilina G, expressa pelos cocos Gram-positivos, especialmente para *M. luteus*, e a alta resistência a ampicilina, demonstrada pelos bacilos Gram-negativos, é tradicionalmente associada à produção de β-lactamases. Ademais, muitas bactérias possuem resistência intrínseca devido a fatores fisiológicos e bioquímicos inerentes ao próprio microrganismo, como é o caso de *P. mirabilis* e algumas espécies de *Pseudomonas*, as quais demonstram resistência natural a nitrofurantoína e tetraciclina (MURRAY et al., 2017).

Tabela 3. Sensibilidade de Cocos Gram-positivos isolados do trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum* por meio de disco difusão.

Microrganismos	n	Antimicrobianos																	
		PEN		NOR		CIP		VAN		TET		CLO		GEN		NIT		SUT	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>E. faecalis</i>	52	50	96,2	48	92,3	52	100,0	52	100,0	52	100,0	52	100,0	16	30,8	52	100,0	38	73,1
<i>E. raffinosus</i>	2	2	100,0	2	100,0	2	100,0	2	100,0	2	100,0	2	100,0	1	50,0	2	100,0	2	100,0
<i>M. luteus</i>	7	3	42,8	5	100,0	7	100,0	7	100,0	7	100,0	7	100,0	7	100,0	7	100,0	6	85,7
<i>S. cohnii</i>	5	4	80,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	3	60,0	5	100,0	5	100,0

Legenda: PEN = Penicilina; NOR = Norfloxacino; CIP = Ciprofloxacino; VAN = Vancomicina; TET = Tetraciclina; CLO = Cloranfenicol; GEN = Gentamicina; NIT = Nitrofurantoína e SUT = Sulfametoxazol + Trimetoprima.

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade de *Enterococcus faecalis* isolados do trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum* por meio de microdiluição em caldo (n=52).

Antimicrobiano	Número de Cepas											CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	Res %
	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32				
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32				
Vancomicina - VAN	5	4	2	26	15	0	0	0	0	0	1	2	0,0	
CIM (µg/mL)	≤0,125	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16				
Linezolida - LZD	6	7	3	12	17	7	0	0	0	0	1	2	0,0	

Legenda: CIM₅₀ e CIM₉₀ = concentrações capazes de inibirem 50% e 90% dos isolados, respectivamente; Res = Resistência.

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 5. Sensibilidade de bacilos Gram-Negativos isolados do trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum* por disco difusão.

Microrganismos	n	Antimicrobianos																	
		AMP		ATM		CRO		CIP		NAL		NIT		IPM		GEN		TET	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacilos Gram-negativos Fermentadores (Enterobacteriaceae):																			
<i>C. koseri</i>	15	0	0,0	15	100,0	15	100,0	15	100,0	15	100,0	15	100,0	15	100,0	15	100,0	15	100,0
<i>P. mirabilis</i>	2	0	0,0	2	100,0	2	100,0	2	100,0	2	100,0	0	0,0	2	100,0	2	100,0	0	0,0
<i>P. rettgeri</i>	4	0	0,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0
<i>S. marcescens</i>	5	0	0,0	2	40,0	5	100,0	5	100,0	2	40,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0
Bacilos Gram-negativos Não Fermentadores (BGNNF):																			
<i>Acinetobacter sp.</i>	3	0	0,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0
<i>A. faecalis</i>	9	0	0,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	5	55,5
<i>Pseudomonas sp.</i>	4	0	0,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0	0	0,0	4	100,0	4	100,0	0	0,0

Legenda: AMP = Ampicilina; ATM = Aztreonam; CRO = Ceftriaxona; CIP = Ciprofloxacino; NAL = Ácido Nalidixico; NIT = Nitrofurantoina; IPM = Imipenem; GEN = Gentamicina e TET = Tetraciclina.

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 6. Perfil de suscetibilidade antifúngica de leveduras isoladas do trato intestinal de insetos adultos de *R. palmarum*.

Leveduras	n	Antifúngicos			
		Fluconazol		Nistatina	
		n	%	n	%
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1	100,0	1	100,0
<i>Candida tropicalis</i>	2	2	100,0	2	100,0
<i>Candida sp.</i>	6	6	100,0	6	100,0

Fonte: Autor, 2021.

A resistência relativamente baixa verificada para as cepas avaliadas pode ser justificada pelo fato desses microrganismos serem provenientes do intestino de insetos encontrados na natureza, isolados de fontes ambientais, os quais não entram em contato com antimicrobianos utilizados nos serviços hospitalares. Em outras palavras, essas cepas não sofreram a pressão seletiva que esses fármacos provocam em um ambiente hospitalar e, por essa razão, muitos genes regulatórios da expressão dessas formas de resistência não foram acionados, favorecendo uma menor ocorrência de mecanismos de resistência e, conseqüentemente, maior sensibilidade.

É considerável ressaltar que essas cepas podem, inclusive, carregar potenciais genes de resistência, os quais ainda não foram expressos e, portanto, não podem ser percebidos pelas técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo, tornando importante a realização de ensaios futuros de biologia molecular para identificar a presença desses genes.

5.4 Identificação de *Thielaviopsis paradoxa*

Os isolamentos realizados a partir da parte externa (carapaça) de insetos adultos de *R. palmarum* evidenciaram 15,0% de crescimento micelial de *T. paradoxa*, correspondente a três insetos infectados de um total de 20 analisados, sendo dois machos e uma fêmea. Não foi encontrado *T. paradoxa* no trato intestinal dos insetos avaliados, conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Número de insetos adultos de *R. palmarum* infectados por *T. paradoxa* externamente e internamente no município de Maceió – Al.

Colonização por <i>T. paradoxa</i>	Machos	Fêmeas	Total
Carapaça			
Infectados	2	1	3 (15,0%)
Não infectados	8	9	17 (85,0%)
Total	10	10	20 (100,0%)
Intestino			
Infectados	0	0	0 (0,0%)
Não infectados	10	10	20 (100,0%)
Total	10	10	20 (100,0%)

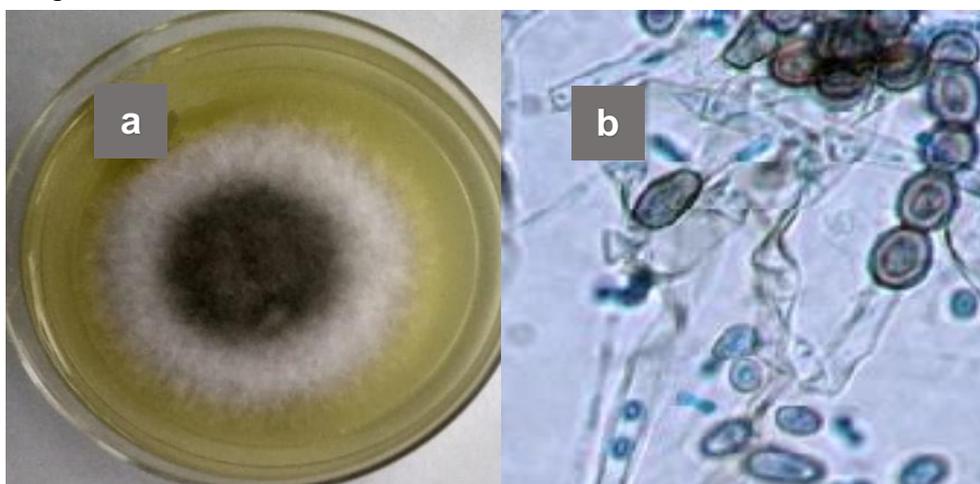
Fonte: Autor, 2021.

Os resultados encontrados neste estudo foram diferentes aos observados por Costa e Carvalho et al. (2011), quando isolaram *T. paradoxa* da carapaça (99,6%) e do tubo digestivo (77,5%) de *R. palmarum* capturados no município de Neópolis – SE. O baixo percentual de isolamento de *T. paradoxa* verificado nesta pesquisa pode ser explicado pela baixa ocorrência de focos de resinose do coqueiro na região de Maceió - AL.

Costa e Carvalho et al. (2011) esclarecem que *R. palmarum* não é um hospedeiro natural deste fungo, adquirindo-o durante sua alimentação em plantações contaminadas. De acordo com Nascimento et al. (2020), *T. paradoxa* é um patógeno que causa infecção através de ferimentos e das fissuras naturais, podendo disseminar-se principalmente através de insetos vetores, como *R. palmarum*, ou por meio do solo e ferramentas contaminadas.

Com relação aos aspectos morfológicos, *T. paradoxa* apresentou macroscopicamente textura aveludada com micélio ralo e aéreo, de crescimento rápido ocupando quase toda a superfície da placa de Petri após 48 horas de incubação. Observou-se durante 3 dias de crescimento que a coloração apresentou variação, exibindo micélio branco, entre os dois primeiros dias, e coloração negra ao terceiro dia. Microscopicamente foram observados conídios primários, denominados endoconídios, os quais são asseptados, hialinos e retangulares; conídios secundários, asseptados, amarronzados, oblongos a ovais; e aleurioconídios, esféricos e lisos, de paredes espessas e marrons (WARWICK; PASSOS, 2009), conforme figura 23.

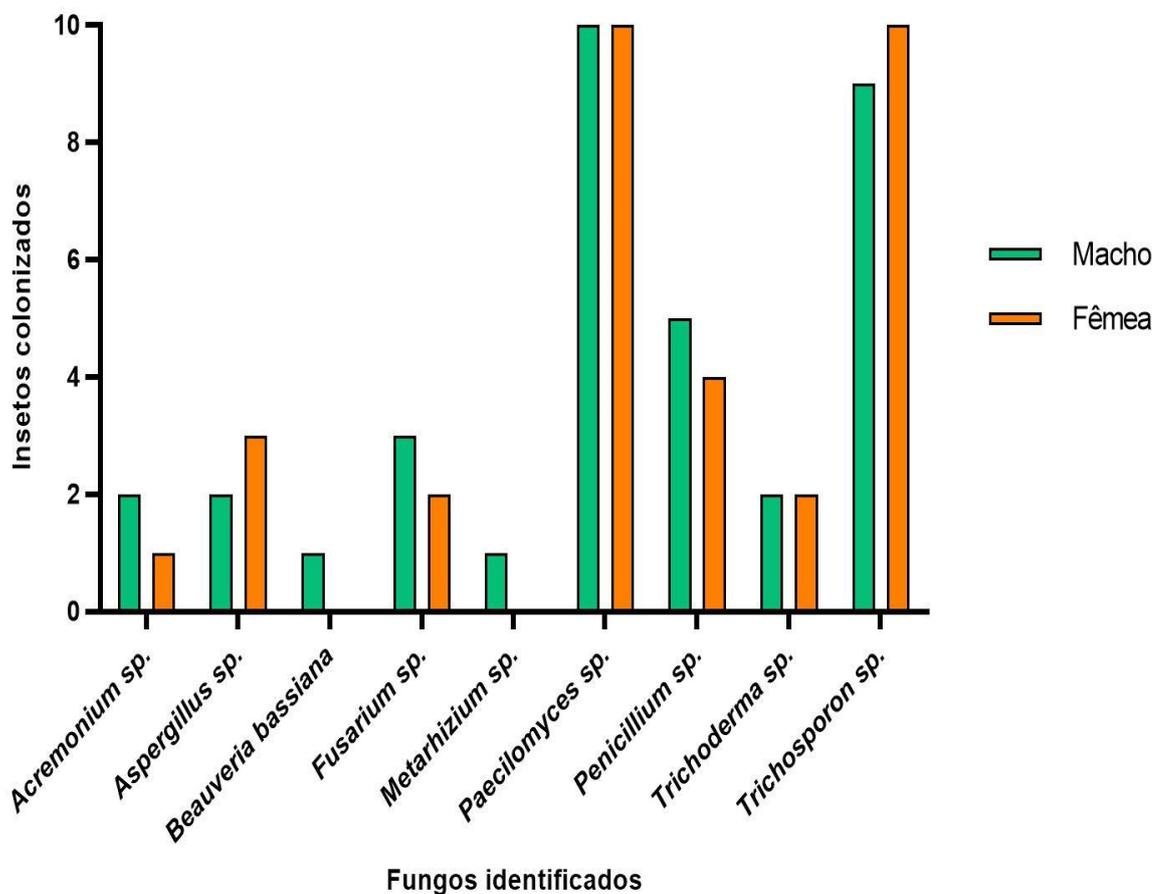
Figura 23. *Thielaviopsis paradoxa*. (a) Aspectos macroscópicos em ágar BDA após 48 horas de incubação; (b) Aspectos microscópicos em lâmina corada com lactofenol azul de algodão, aumento de 400X.



Fonte: Autor, 2021; Santos et al., 2012.

Além de *T. paradoxa*, vários outros fungos foram identificados na carapaça de *R. palmarum*, os quais estão apresentados na figura 24. *Paecilomyces* sp. foi isolado em todos os insetos avaliados, seguido por *Trichosporon* sp., presente em 19 insetos (95,0%). Também foram identificados *Penicillium* sp. (45,0%), *Fusarium* sp. (25,0%), *Aspergillus* sp. (25,0%), *Trichoderma* sp. (20,0%), *Acremonium* sp. (15,0%), *Metarhizium* sp. (5,0%) e *Beauveria bassiana* (5,0%).

Figura 24. Fungos identificados no exoesqueleto de insetos adultos de *R. palmarum* capturados na cidade de Maceió – Al.



Fonte: Autor, 2021.

Os animais são meios transientes e ricos em nutrientes. A capacidade de vários microrganismos em explorar o habitat animal envolve múltiplas características, incluindo mecanismos que evitam ou modulam o sistema imunológico e adaptações metabólicas para utilizar os recursos do hospedeiro. Fungos associados a insetos incluem patógenos, cuja aptidão está associada à debilidade do hospedeiro, e formas

benéficas que contribuem com nutrientes, conferem proteção e atuam em processos metabólicos promovendo o bom desempenho do hospedeiro (WONG et al., 2015).

Os insetos podem atuar como vetores mecânicos de fungos em diversas culturas vegetais de importância para o consumo humano e animal (AQUINO; POTENZA, 2013). Além disso, esses artrópodes podem ser infectados por fungos entomopatogênicos, muito utilizados como agentes de controle biológico de insetos-pragas, o que evidencia a importância de se identificar sua microbiota.

Como o exoesqueleto do inseto é formado principalmente por quitina e queratina (TETREAU; WANG, 2019), sua carapaça constitui um ambiente favorável a colonização por diversos fungos filamentosos que utilizam esses nutrientes para seu crescimento. Embora muitos fungos isolados em *R. palmarum* possam ser considerados simbioses em insetos e comensais de plantas, algumas espécies apresentam patogenicidade para determinados vegetais, seja por sua ação direta ou pela produção de micotoxinas, como é o caso de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

Fusarium sp. é responsável por muitas doenças em plantas de interesse econômico, embora estejam relacionados também a produção de muitos compostos benéficos que inibem o crescimento de fitopatógenos que danificam espécies agrícolas (HUSAINI; SAKINA; CAMBAY, 2018). Entre as plantas agrícolas economicamente importantes que podem ser afetadas por *Fusarium*, destacam-se o abacaxi (SILVA et al., 2020), milho (TOROVIC, 2018), soja (SCHOLLENBERGER ET AL., 2007 e trigo (ORLANDO et al., 2019). Com relação à *Penicillium* e *Aspergillus*, algumas espécies são produtoras de toxinas e apresentam importância econômica para a indústria de cereais (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Fungos endofíticos e entomopatogênicos importantes também foram isolados da parte externa de *R. palmarum*, como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma* sp. Embora muitos insetos habitem com sucesso ambientes perigosos expostos a diversas comunidades microbianas, eles podem ser frequentemente colonizados e/ou mortos por patógenos especializados (BUTT et al., 2016).

Fungos entomopatogênicos são organismos que evoluíram para explorar insetos, compreendendo uma ampla gama de espécies de fungos morfológica, filogeneticamente e ecologicamente diversas (ARAÚJO; HUGHES, 2016). Esses fungos têm sido desenvolvidos como alternativas ecologicamente corretas aos

inseticidas químicos em programas de biocontrole de pragas agrícolas e vetores de doenças (ZHAO; LOVETT; FANG, 2016).

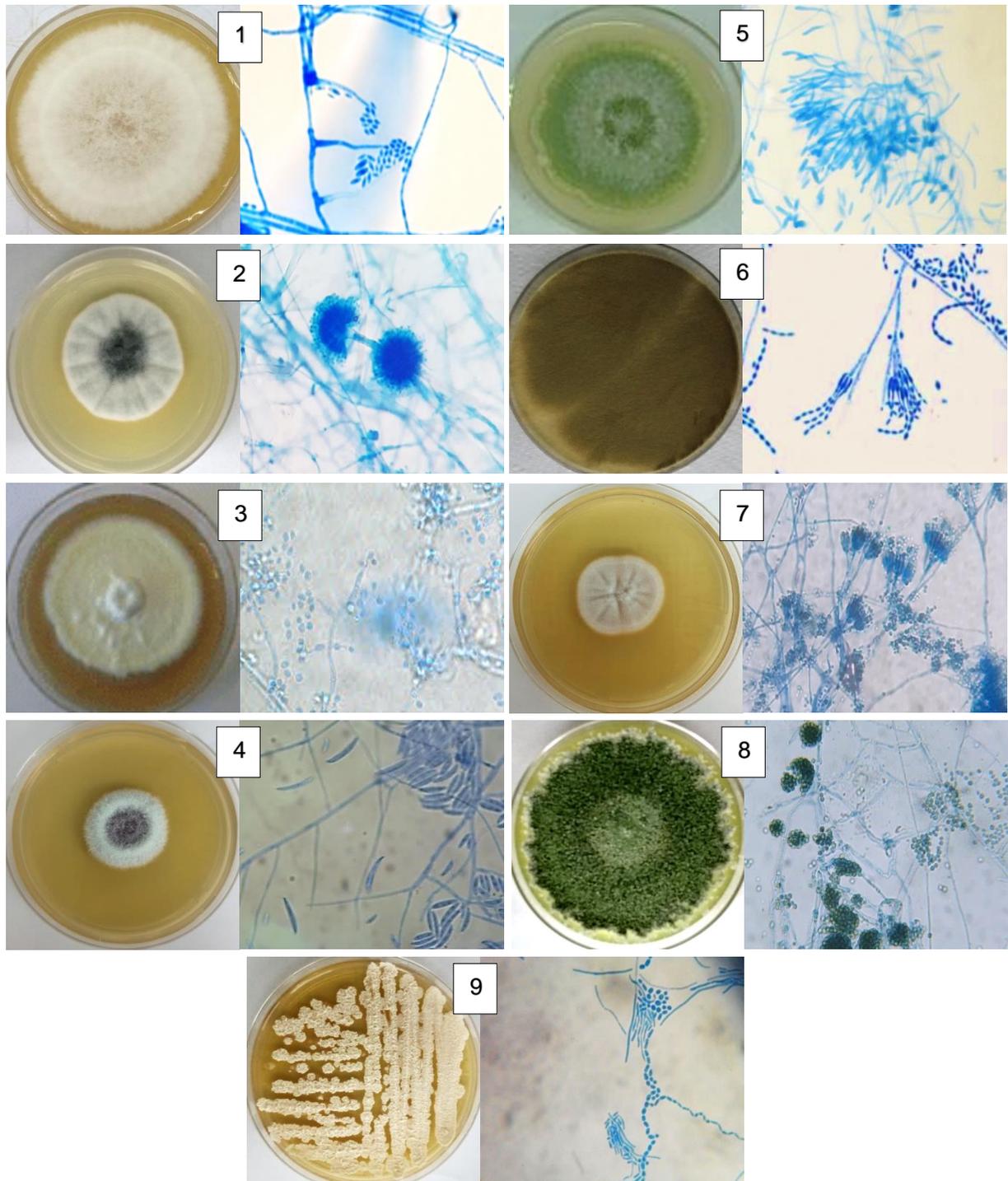
Paecilomyces sp. foi o fungo mais abundante na carapaça, estando presente em todos os insetos avaliados, aparentemente sem causar danos, o que indica que provavelmente a espécie que o está colonizando desempenha uma relação de comensalismo. Entretanto, a identificação molecular e ensaios de patogenicidade são necessários para confirmar essa hipótese.

Dentre os fungos entomopatogênicos identificados em *R. palmarum*, os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* se destacam como potenciais na patogenia de insetos, sendo constantemente utilizados por pesquisadores no controle de pragas agrícolas (JABER; ENKERLI, 2016). *Trichoderma* também é outro microrganismo importante utilizado como forma de controle biológico. Esse fungo apresenta uma importante função ecológica, pois participa da decomposição e mineralização de resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas. Além disso, possui crescimento rápido e é considerado um excelente biofungicida natural, diminuindo as chances de outros fungos atingirem a cultura (LIMA, 2014).

A suscetibilidade de *R. palmarum* a diferentes fungos entomopatogênicos foi demonstrada por vários autores. Almeida et al. (2010) estudaram a sensibilidade de *R. palmarum* à ação de isolados de *Metarhizium anisopliae* e observaram que uma cepa denominada IBCD348, isolada de *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha-da-cana-de-açúcar), é patogênica à *R. palmarum* e pode ser utilizada em conjunto com inseticidas. Em outro estudo, Lima et al. (2020) comprovaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* e *T. harzianum* sobre *R. palmarum*, os quais representam boas alternativas para o controle biológico desta praga.

Na figura 25 estão apresentados os aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos identificados na parte externa de *R. palmarum* capturados na cidade de Maceió – Al.

Figura 25. Aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos identificados na carapaça de *R. palmarum*, cultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose a 28°C. Lâminas coradas com lactofenol azul-algodão. Amostras: 1) *Acremonium* sp.; 2) *Aspergillus* sp.; 3) *Beauveria bassiana*; 4) *Fusarium* sp.; 5) *Metarhizium* sp.; 6) *Paecilomyces* sp.; 7) *Penicillium* sp.; 8) *Trichoderma* sp.; 9) *Trichosporon* sp.



Fonte: Autor, 2021.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, identificou-se pela primeira vez a microbiota intestinal cultivável de insetos da espécie *R. palmarum*, composta principalmente por microrganismos aeróbios facultativos e com metabolismo fermentativo, pertencentes aos Filos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Ascomycota. As microbiotas intestinais se mostraram bastante diversificadas com poucas diferenças observadas entre os sexos, sendo *E. faecalis* a espécie mais abundante no intestino de ambos os sexos, seguida por *C. koseri* em machos e *B. cereus* em fêmeas.

O trato intestinal de *R. palmarum* mostrou ser um reservatório importante de microrganismos que apresentam capacidade de degradação enzimática de celulose, sendo identificadas seis espécies bacterianas e uma fúngica com atividade celulolítica, com destaque para *B. cereus* (IE = 4,6) que produziu as maiores zonas de hidrólise e pode desempenhar papel promissor em futuras aplicações biotecnológicas.

Com relação ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos, os isolados apresentaram, de uma maneira geral, baixa resistência, que pode ser justificada pelo fato desses microrganismos serem provenientes do intestino de insetos presentes na natureza, os quais possivelmente não entram em contato com antimicrobianos e não sofrem a pressão seletiva que esses fármacos exercem em um ambiente hospitalar, diminuindo o surgimento de mecanismos de resistência.

A pesquisa de *T. paradoxa* no exoesqueleto resultou na identificação do fungo em 15% dos insetos avaliados, confirmando que *R. palmarum* é carreador deste fitopatógeno e desempenha papel importante na transmissão da resinose do coqueiro. Em adição, foram identificados fungos endofíticos da carapaça de *R. palmarum*, incluindo fitopatógenos importantes, como *Fusarium* sp., e fungos entomopatogênicos, como *Paecilomyces* sp., presente em todos os insetos avaliados.

Esses achados abrem perspectivas interessantes no desenvolvimento de novas estratégias para o controle simbiótico de *R. palmarum*, reforçando a importância de estudos subsequentes com foco na caracterização metagenômica e em aspectos funcionais dos microrganismos que habitam o intestino deste inseto, a fim de se determinar quais simbioses podem exercer um papel essencial em seu ciclo de vida e na competência vetorial e, assim, elaborar estratégias de controle visando uma abordagem de manejo integrado de pragas por meio de interferências na simbiose intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 473–493, 2018.
- ADAMS, L.; BOOPATHY, R. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1592-1598, 2005.
- AHARON, Y.; PASTERNAK, Z.; YOSEF, M. B.; BEHAR, A.; LAUZON, C.; YUVAL, B.; JURKEVITCH, E. Phylogenetic, metabolic, and taxonomic diversities shape mediterranean fruit fly microbiotas during ontogeny. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 303-313, 2013.
- AHMAD, A.; BROCE, A.; ZUREK, L. Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1129-1133, 2006.
- AKONDI, K. B.; LAKSHMI, V. V. Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 17, n. 2, p. 61-70, 2013.
- ALMEIDA, A. M. B.; BATISTA FILHO, A.; TAKADA, H. M.; LEITE, L. G.; ZAPPELINI, L. O.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E. M.; CARVALHO, A. G. Suscetibilidade de *Rhynchophorus palmarum* à ação de *Metarhizium anisopliae* e compatibilidade do entomopatógeno com agrotóxicos utilizados na cultura da banana. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 661-668, 2010.
- ALMEIDA, A. M. B.; BATISTA FILHO, A.; TAVARES, F. M.; LEITE, L. G. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 489 - 493, 2009.
- ALMEIDA, L. G. **Metabolização de xenobióticos e produção de bioinseticidas por bactérias associadas a insetos**. 111f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.
- ALMEIDA, L. G. **Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro**. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 2017.
- ÁLVAREZ, E.; LLANO, G. A.; LOKE, J. B.; CHACON, M. I. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 11-12, p. 690-700, 2012.

- ANAND, A. A. P.; VENNISON, S. J.; SANKAR, S. G.; PRABHU, D. I. G.; VASAN, P. T.; RAGHURAMAN, T.; GEOFFREY, C. J.; VENDAN, S. E. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 107, p. 1–20, 2010.
- ANDERSON, K. E.; RICIGLIANO, V. A.; MOTT, B. M.; COPELAND, D. C.; FLOYD, A. S.; MAES, P. The queen gut refines with age: longevity phenotypes in a social insect model. **Microbiome**, v. 6, n. 108, p. 1–16, 2018.
- ANJUM, S. I.; SHAH, A. H.; AURONGZEB, M.; KORI, J.; AZIM, M. K.; ANSARI, M. J.; BIN, L. Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 388–392, 2018.
- AQUINO, S.; POTENZA, M. R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 243–247, 2013.
- ARAÚJO, J. P. M.; HUGHES, D. P. Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? **Advances in Genetics**, v. 94, p. 1–39, 2016.
- AYRES, M. P.; WILKENS, R. T.; RUEL, J.; LOMBARDERO, M. J.; VALLERY, E. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. **Ecology**, v. 81, n. 8, p. 2198–2210, 2000.
- BAKER, W. J.; SAVOLAINEN, V.; ASMUSSEN-LANGE, C. B.; CHASE, M. W.; DRANSFIELD, J.; FOREST, F.; HARLEY, M. M.; UHL, N. W.; WILKINSON, M. Complete generic-level phylogenetic analyses of palms (Arecaceae) with comparisons of supertree and supermatrix approaches. **Systematic Biology**, v. 58, n. 2, p. 240–256, 2009.
- BAPATLA, K. G.; SINGH, A.; YEDDULA, S.; PATIL, R. H. Annotation of gut bacterial taxonomic and functional diversity in *Spodoptera litura* and *Spilosoma obliqua*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 217–226, 2018.
- BAR-SHMUEL, N.; BEHAR, A.; SEGOLI, M. What do we know about biological nitrogen fixation in insects? Evidence and implications for the insect and the ecosystem. **Insect Science**, v. 27, n. 3, p. 392–403, 2020.
- BASSET, Y.; CIZEK, L.; CUÉNOUD, P.; DIDHAM, R. K.; GUILHAUMON, F.; MISSA, O. et al. Arthropod diversity in a tropical forest. **Science**, v. 338, n. 6113, p. 1481–1484, 2012.
- BATALHA, M. M. C.; GOULART, H. F.; SANTANA, A. E. G.; BARBOSA, L. A. O.; NASCIMENTO, T. G.; SILVA, M. K. H.; DORNELAS, C. B.; GRILLO, L. A. M. Chemical composition and antimicrobial activity of cuticular and internal lipids of the insect *Rhynchophorus palmarum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 1, p. e21723, 2020.

BÉDIKOU, E. M.; KONÉ, M. F.; AHI, A. P.; GONNETY, J. T.; FAULET, B. M.; KOUAMÉ, L. P.; NIAMKÉ, S. L. α -Mannosidases from the digestive fluid of *Rhynchophorus Palmarum* larvae as novel biocatalysts for transmannosylation reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 307–320, 2010.

BERASATEGUI, A.; SHUKLA, S.; SALEM, H.; KALTENPOTH, M. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1567–1577, 2016.

BERLANGA, M.; PALAU, M.; GUERRERO, R. Gut microbiota dynamics and functionality in *Reticulitermes grassei* after a 7-day dietary shift and ciprofloxacin treatment. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0209789, 2018.

BIER, D.; TUTIJA, J. F.; PASQUATTI, T. N.; OLIVEIRA, T. L.; ARAÚJO, F. R.; VERBISCK, N. V. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1373–1379, 2017.

BIRKLE, L. M.; MINTO, L. B.; DOUGLAS, A. E. Relating genotype and phenotype for tryptophan synthesis in an aphid–bacterial symbiosis. **Physiological Entomology**, v. 27, n. 4, p.302–306, 2002.

BIRKLE, L. M.; MINTO, L. B.; WALTERS, K. F. A.; DOUGLAS, A. E. Microbial genotype and insect fitness in an aphidbacterial symbiosis. **Functional Ecology**, v. 18, n. 4, p. 598–604, 2004.

BLANTON, A. G.; PETERSON, B. F. Symbiont-mediated insecticide detoxification as an emerging problem in insect pests. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 547108, p. 1–7, 2020.

BOARI, A. J.; GOMES JÚNIOR, R. A.; TINÔCO, R. S.; PINA, A. J. A. **Anel-vermelho da palma de óleo**. Belém - PA: Embrapa Amazônica Oriental, 2016.

BOLOGNINI, D.; TOBIN, A. B.; MILLIGAN, G.; MOSS, C. E. The pharmacology and function of receptors for short-chain fatty acids. **Molecular Pharmacology**, v. 89, n. 3, p. 388-398, 2016.

BOZOROV, T. A.; RASULOV, B. A.; ZHANG, D. Characterization of the gut microbiota of invasive *Agrilus mali* Matsumara (Coleoptera: Buprestidae) using high-throughput sequencing: uncovering plant cell-wall degrading bacteria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

BRIONES-ROBLERO, C. I.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, R.; SANTIAGO-CRUZ, J. A.; ZÚÑIGA, G.; RIVERA-ORDUÑA, F. N. Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 1, p. 1–9, 2017.

BRODERICK, N. A.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K. F. Effect of host diet and insect source on synergy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)

mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* by zwittermicin A. **Environmental Entomology**, v. 32, n. 2, p.387-391, 2003.

BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 293-300, 2004.

BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 41, p. 15196-15199, 2006.

BRUMATTI, C. R.; SOUZA, C. W. O. **Controle Biológico**. 15 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

BURKE, G. R.; NORMARK, B. B.; FAVRET, C.; MORAN, N. A. Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5328-5335, 2009.

BUSTAMANTE-BRITO, R.; LEÓN, A. V.; ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, J. C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Metatranscriptomic analysis of the bacterial symbiont *Dactylopiibacterium carminicum* from the carmine cochineal *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). **Life (Basel)**, v. 9, n. 4, p 1 - 18, 2019.

BUTT, T. M.; COATES, C. J.; DUBOVSKIY, I. M.; RATCLIFFE, N. A. Chapter nine - Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 307-364, 2016.

CAI, R.; CHENG, C.; CHEN, J.; XU, X.; DING, C.; GU, B. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the mucus layer in the colon. **Gut Microbes**, v. 11, n. 4, p. 680–690, 2020.

CANFORA, E. E.; JOCKEN, J. W.; BLAAK, E. E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 10, p. 577-591, 2015.

CARDOSO, A. M. et al. Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an invasive snail reveals a rich reservoir of novel genes. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48505, 2012.

CAROZO, J. P. G. **Perfil sócio-econômico dos produtores de coco (*Cocos nucifera* L.), do Município de Piaçabuçu – Alagoas**. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.

CARREÑO-CORREA, R. D.; SALAZAR-MERCADO, S. A., ESPINEL-RODRÍGUEZ, M. Evaluación de cebos para el control de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera:

Curculionidae) en el cultivo de *Elaeis guineensis* Jacq (Arecales: Arecaceae). **Revista Agronomía**, v. 21, n. 2, p. 65–72, 2013.

CASTRO, J. M. C.; LIMA, C. R. F.; SANTANA, M. L. M, P. **Nematoide do anel vermelho do coqueiro e medidas de manejo**. Petrolina - PE: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2009.

CHANDLER, J. A.; LANG, J. M.; BHATNAGAR, S.; EISEN, J. A.; KOPP, A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 9, p. e1002272, 2011.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **The Insects: Structure and Function**. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 2013.

CHEN, B.; TEH, B.-S.; SUN, C.; HU, S.; LU, X.; BOLAND, W.; SHAO, Y. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29505, 2016.

CHEN, B.; YU, T.; XIE, S.; DU, K.; LIANG, X.; LAN, Y.; SUN, C.; LU, X.; SHAO, Y. Comparative shotgun metagenomic data of the silkworm *Bombyx mori* gut microbiome. **Scientific Data**, v. 5, n. 1, p. 180285, 2018.

CHEN, M. X.; WANG, S. Y.; KUO, C. H.; TSAI, I. L. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 118, n. 1, p. 10-22, 2019.

CHENG, D.; GUO, Z.; REIGLER, M.; XI, Z.; LIANG, G.; XU, Y. Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 13, 2017.

CHOUAIA, B.; ROSSI, P.; EPIS, S.; MOSCA, M.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; ULISSI, U.; CROTTI, E.; DAFFONCHIO, D.; BANDI, C.; FAVIA, G. Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. **BMC Microbiology**, v.12, n. 1, p. 1-8, 2012.

CHUNG, S. H.; PARKER, B. J.; BLOW, F.; BRISSON, J. A.; DOUGLAS, A. E. Host and symbiont genetic determinants of nutritional phenotype in a natural population of the pea aphid. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 4, p. 848–858, 2020.

CLARK, R. I.; SALAZAR, A.; YAMADA, R.; FITZ-GIBBON, S.; MORSELLI, M.; ALCARAZ, J.; RANA, A.; RERA, M.; PELLEGRINI, M.; JA, W. W.; WALKER, D. W. Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality. **Cell Reports**, v. 12, n. 10, p. 1956-1667, 2015.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**.

11th ed. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

COELHO, I. L. **Potencial de levedura no biocontrole da resinose do coqueiro, causada por *Ceratocystis paradoxa***. 58f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.

CORBY-HARRIS, V.; PONTAROLI, A. C.; SHIMKETS, L.; BENNETZEN, J. L.; HABEL, K. E.; PROMISLOW, D. E. L. Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3470-3479, 2007.

CORREIA, R. G. **Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum*, *Metamasius hemipterus*, e do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* em plantios de dendê (*Elaeis guineensis*)**. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2011.

COSTA E CARVALHO, R. R. DA; SOUZA, P. E. DE; WARWICK, D. R. N.; POZZA, E. A.; CARVALHO FILHO, J. L. S. DE. Spatial and temporal analysis of stem bleeding disease in coconut palm in the state of sergipe, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1567–1576, 2013.

COSTA E CARVALHO, R. R.; WARWICK, D. R. N.; SOUZA, P. E.; CARVALHO FILHO, J. L. S. Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 1–6, 2011.

COSTA, M. M. **Caracterização química e avaliação das atividades antimicrobianas da cutícula do inseto adulto de *Rhynchophorus palmarum***. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, 2016.

CYSNE, A. Q.; CRUZ, B. A.; CUNHA, R. N. V. DA; ROCHA, R. N. C. DA. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p. 197–202, 2013.

CYSNE, A. Q.; RIOS, S. A.; JKRUG, C.; LIMA, W. A. A. **Manejo de *Rhynchophorus palmarum* em Campo de Produção de Sementes de Palma de Óleo**. Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013.

DANTUR, K. I.; ENRIQUE, R.; WELIN, B.; CASTAGNARO, A. P. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 15, 2015.

DAWADI, B.; WANG, X.; XIAO, R.; MUHAMMAD, A.; HOU, Y.; SHI, Z. PGRP-LB homolog acts as a negative modulator of immunity in maintaining the gut-microbe

symbiosis of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 86, p. 65-77, 2018.

DAZA, F. F. F.; ROMAN, G. R.; RODRIGUEZ, M. V.; VARGAS, I. A. G.; HEANO, H. C.; CEREDA, M. P.; MULET, R. A. C. Spores of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum* as a bioinsecticide for the control of *Atta cephalotes*. **Biological Research**, v. 52, n. 51, p. 1 - 8, 2019.

DE LA TORRE, R. C. A.; DE LA TORRE, J. A. A.; MOYA, O. M.; PARDEY, A. E. B. **El anillo rojo em palma de aceite**. Bogotá - Colômbia: Cenipalma, 2015.

DEMBILIO, O.; MOYA, P.; VACAS, S.; ORTEGA-GARCÍA, L.; QUESADA-MORAGA, E.; JAQUES, J. A.; NAVARRO-LLOPIS, V. Development of an attract-and-infect system to control *Rhynchophorus ferrugineus* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Pest Management Science**, v. 74, n. 8, p. 1861-1869, 2018.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Reviews in Entomology**, v. 49, n. 1, p. 71-92, 2004.

DOUGLAS, A. E. Lessons from studying insect symbioses. **Cell host & Microbe**, v. 10, n. 4, p. 359-367, 2011.

DOUGLAS, A. E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 17–34, 2015.

DOUGLAS, E. E. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 338-342, 2007.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, v. 23, n. 1, p. 38–47, 2009.

DOUGLAS, A. E. The molecular basis of retinoblastomas. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 23, p. 3830–3837, 2014.

DUARTE, A. G. **Infoquímicos no controle de *Rhynchophorus palmarum* (L., 1758) e *Metamasius hemipterus* L., 1758 (COL.: Curculionidae): Formulação de Feromônio; Monitoramento; Manejo do Subproduto da casca do coco**. 2015. 116f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2015.

DUARTE, A. G., LIMA, I. S., ARAÚJO JÚNIOR, J. V., DUARTE, A. G., ALBUQUERQUE, A. L. S., CRUZ, M. M. Disposição do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, em coqueiros portadores da doença anel-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 622–627, 2008.

DUARTE, A. G.; LIMA, I. S. Eficiência de diferentes taxas de liberação do feromônio de agregação na captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 217–221, 2001.

DUARTE, A. G.; LIMA, I. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas com feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 81-84, 2003.

DUBIN, K.; PAMER, E. G. Enterococci and their interactions with the intestinal microbiome. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 6, p. 1-24, 2014.

EMERY, O.; SCHMIDT, K.; ENGEL, P. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). **Molecular Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2576-2590, 2017.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

ERBAN, T.; LEDVINKA, O.; NESVORNA, M.; HUBERT, J. Experimental manipulation shows a greater influence of population than dietary perturbation on the microbiome of *Tyrophagus putrescentiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 9, p. 1–16, 2017.

ERDMANN, G. R. Antibacterial action of Myiasis-causing flies. **Parasitology Today**, v. 3, n. 7, p. 214-216, 1987.

FANG, Y. et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, n. 12, p. 567-576, 2011.

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

FELLOWS, R. et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 105, 2018.

FERRARI, J.; VAVRE, F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1569, p. 1389–1400, 2011.

FERREIRA, J. M. S. Manejo integrado de pragas do coqueiro. **Ciência Agrícola**, v. 8, n. 1, p. 21-29, 2008.

FERREIRA, J. M. S.; LEAL, M. L. S.; SARRO, F. B.; ARAÚJO, R. P. C.; MOURA, J. I. L. Avaliação de diferentes fontes atrativas e suas prováveis interações na captura de *Rhynchophorus palmarum*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)**, v. 67, p. 23-29, 2003.

FERREIRA, J. M. S.; TEODORO, A. V.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; GUZZO, E. C. **Manejo integrado da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae)**. Aracaju – SE: Embrapa Amazônia Ocidental, 2014.

FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A.; Cultura do Coqueiro no Brasil; EMBRAPA-SPI; Aracaju, 1994; p.309.

FERREIRA, J. M.; LEAL, M. L. S.; SARRO, F. B.; ARAÚJO, R. P., MOURA, J. I. L. Avaliação de diferentes fontes atrativas e suas prováveis interações na captura de *Rhynchophorus palmarum*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)**, V. 67, p. 23–29, 2003.

FISHER, M. L.; LEVINE, J. F.; GUY, J. S.; MOCHIZUK, H.; BREEN, M.; SCHAL, C.; WATSON, D. W. Lack of influence by endosymbiont *Wolbachia* on virus titer in the common bed bug, *Cimex lectularius*. **Parasites & Vectors**. v. 12, n. 1, p. 436, 2019.

FLÓREZ, L. V.; BIEDERMANN, P. H. W.; ENGL, T.; KALTENPOTH, M. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 904–936, 2015.

FONTES-PEREZ, H.; OLVERA-GARCÍA, M.; CHÁVEZ-MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ-ALMEIDA, F. A.; ARZOLA-ALVAREZ, C. A.; SANCHEZ-FLORES, A.; CORRAL-LUNA, A. Genome sequence of *Citrobacter* sp. CtB7.12, isolated from the gut of the Desert subterranean termite *Heterotermes aureus*. **genomeA**, v. 3, n. 6, p. e01290-15, 2015.

FOTI, M.; GIACOPELLO, C.; BOTTARI, T.; FISICHELLA, V.; RINALDO, D.; MAMMINA, C. Antibiotic resistance of Gram negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n.9, p. 1363-1366, 2009.

GALAC, M. R.; LAZZARO, B. P. Comparative genomics of bacteria in the genus *Providencia* isolated from wild *Drosophila melanogaster*. **BMC Genomics**, v.13, n. 612, p. 1-18, 2012.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MACHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10. 920 p., 2002.

GANDOTRA, S.; KUMAR, A.; NAGA, K.; BHUYAN, P. M.; GOGOI, D. K.; SHARMA, K.; SUBRAMANIAN, S. Bacterial community structure and diversity in the gut of the muga silkworm, *Antheraea assamensis* (Lepidoptera: Saturniidae), from India. **Insect Molecular Biology**, v. 27, n. 5, p. 603–619, 2018.

GASPAROTTO, O. C; SIEBERT, M. N; HENNEMANN, M. C; COELHO, C. M. R; GRANUCCI, N; SILVA, B. L; SILVA, F. C. M. **Fisiologia animal comparada**. BIOLOGIA/EAD/UFSC, 1ª ed., Florianópolis - SC, 2011.

GIJZEN, H. J.; VAN DER DRIFT., C.; BARUGAHARE, M.; OP DEN CAMP, H. J. Effect of host diet and hindgut microbial composition on cellulolytic activity in the hindgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1822-1826, 1994.

- GREENBERG, B.; KLOWDEN, M. Enteric bacterial interactions in insects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 25, n. 12, p. 1459-1466, 1972.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press, 2005.
- GUPTA, A. K.; NAYDUCH, D.; VERMA, P.; SHAH, B.; GHATE, H. V.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 581-593, 2012.
- HA, E. M.; OH, C. T.; BAE, Y. S.; LEE, W. J. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity, **Science**, v. 310, n. 5749, p. 847-850, 2005.
- HABINEZA, P.; MUHAMMAD, A.; JI, T.; XIAO, R.; YIN, X.; HOU, Y.; SHI, Z. The promoting effect of gut microbiota on growth and development of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Dryophthoridae) by modulating its nutritional metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1212, p. 1–10, 2019.
- HAJJAR, M. J.; AJLAN, A. M.; AL-AHMAD, M. H. New approach of *Beauveria bassiana* to control the red palm weevil (Coleoptera: Curculionidae) by trapping technique. **Biological and Microbial Control**, v. 108, n. 2, p. 425-432, 2015.
- HALFFTER, G.; MORENO, C. E.; PINEDA, E. **Manual para la evaluación de la biodiversidad en Reservas de la Biósfera**. CYTED. 2001.
- HAMMERUM, A. M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 619-625, 2012.
- HAN, G.; LEE, H. J.; JEONG, S. E.; JEON, C. O.; HYUN, S. Comparative Analysis of *Drosophila melanogaster* gut microbiota with respect to host strain, sex, and age. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 1, p. 207–216, 2017.
- HANDIQUE, G.; PHUKAN, A.; BHATTACHARYYA, B.; BARUAH, A. A. L. H.; RAHMAN, S. W.; BARUAH, R. Characterization of cellulose degrading bacteria from the larval gut of the white grub beetle *Lepidiota mansueta* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 2, p. 1–8, 2017.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, J. A.; BRIONES-ROBLERO, C. I.; RIVERA-ORDUNA, F. N.; ZÚNIGA, G. Revealing the gut bacteriome of *Dendroctonus* bark beetles (Curculionidae: Scolytinae): diversity, core members and co-evolutionary patterns. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13864, 2017.
- HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a000232, 2009.
- HIROSE, E.; PANIZZI, A.R. Os simbioses e a nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos: bases para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 251-276.

HODDLE, M. S.; HODDLE, C. D.; MILOSAVLJEVIĆ, I. How Far Can *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) Fly? **Journal of economic entomology**, v. 113, n. 4, p. 1786–1795, 2020.

HU, X.; LI, M.; CHEN, H. Community structure of gut fungi during different developmental stages of the Chinese white pine beetle (*Dendroctonus armandi*). **Scientific Reports**, v. 5, n. 8411, p. 1–7, 2015.

HU, Y.; XIE, H.; GAO, M.; HUANG, P.; ZHOU, H.; MA, Y.; ZHOU, M.; LIANG, J.; YANG, J.; LV, Z. Dynamic of composition and diversity of gut microbiota in *Triatoma rubrofasciata* in different developmental stages and environmental conditions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 587708, p. 1–17, 2020.

HUGHES, G. L.; KOGA, R.; XUE, P.; FUKATSU, T.; RASGON, J. L. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002043, 2011.

HUSAINI, A. M.; SAKINA, A.; CAMBAY, S. R. Host–pathogen interaction in *Fusarium oxysporum* infections: where do we stand? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 9, p. 889–898, 2018.

IBANEZ, S.; GALLET, C.; DESPRÉS, L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. **Toxins**, v. 4, n. 4, p. 228–243, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. **Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Jan. 2019. IBGE, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 1 - 81, Jan. 2019.

JABER, L. R.; ENKERLI, J. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. **Biological control**, v. 103, p. 187–195, 2016.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JESUS JÚNIOR, L. A.; TOMMASI, A. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. M.; RUSSO, S. L. Análise da produção de coco no estado de Sergipe frente ao crescimento da cultura no Nordeste e no Brasil. **GEINTEC**, v. 3, n. 5, p. 400–408, 2013.

JHO, Y. S.; PARK, D. H.; LEE, J. H.; CHA, S. Y.; HAN, J. S. Identification of bacteria from the oral cavity and cloaca of snakes imported from Vietnam. **Laboratory Animal Research**, v. 27, n. 3, p. 213–217, 2011.

JIA, S. et al. Seasonally variable intestinal metagenomes of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 3020–3029, 2013.

JING, T. Z.; QI, F. H.; WANG, Z. Y. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision? **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2020.

JÓZEFIAK, A.; NOGALES-MÉRIDA, S.; RAWSKI, M.; KIEROŃCZYK, B.; MAZURKIEWICZ, J. Effects of insect diets on the gastrointestinal tract health and growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 348, 2019.

JULIANO, S. A. Population dynamics. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2, p. 265–275, 2007.

KAJLA, M. K. Symbiotic bacteria as potential agents for mosquito control. **Trends in Parasitology**, v. 36, p. 1, p. 4-7, 2020.

KALLIMANIS, A.; KAVAKIOTIS, K.; PERISYNAKIS, A.; SPROER, C.; PUKALL, R.; DRAINAS, C.; KOUKKOU, A. I. *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, 275-279, 2009.

KAMBRIS, Z. et al. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001143, 2010.

KARAMIPOUR, N.; FATHIPOUR, Y.; MEHRABADI, M. Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, v. 6, n. 33168, p. 1-12, 2016.

KASHIMA, T.; NAKAMURA, T.; TOJO, S. Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 8, p. 816-825, 2006.

KHAN, K. A.; AL-GHAMDI, A. A.; GHARAMH, H. A.; ANSARI, M. J.; ALI, H.; ALAMRI, S. A.; AL-KAHTANI, S. N.; ADGABA, N.; QASIM, M.; HAFEEZ, M. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, n. 103793, p. 1–12, 2020.

KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A.; TAGO, K.; FUKATSU, T. Symbiont-mediated insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 22, p. 8618–8622, 2012.

KLEPZIG, K.D.; ADAMS, A.S.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K.F. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 1, p. 67-77, 2009.

KOH, A.; VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BACKHED, F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332-1345, 2016.

- KRAMS, I. A. et al. Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 22, p. 4204–4212, 2017.
- KTARI, N.; KHALED, H. B.; NASRI, R.; JELLOULI, K.; GHORDEL, S.; NASRI, M. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterization and potential application as a detergent additive. **Food Chemistry**, v. 130, p. 467-474, 2012.
- KUDO, R.; MASUYA, H.; ENDOH, R.; KIKUCHI, T.; IKEDA, H. Gut bacterial and fungal communities in ground-dwelling beetles are associated with host food habit and habitat. **The ISME Journal**, v. 13, n. 3, p. 676-685, 2019.
- KWONG, W. K.; MANCENIDO, A.; MORAN, N. A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, v. 4, n. 2, p. 170003, 2017.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. – **Tratado de Micologia médica**; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p.
- LACERDA, I. J. Coqueiro sob ataque. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, v. 6, p. 25-28, 2001.
- LEE, H.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foulbrood disease. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 39-44, 2009.
- LEE, J. H.; LEE, K. A.; LEE, W. J. Microbiota, gut physiology, and insect immunity. **Amsterdam: Elsevier**, v. 52, p. 111–138, 2017.
- LEE, K.A.; KIM, S. H.; KIM, E. K.; HA, E. M.; YOU, H.; KIM, B.; KIM, M. J.; KWON, Y.; RYU, J. H.; LEE, W. J. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 797-811, 2013.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 525-50, 1997.
- LEITÃO-GONÇALVES, R.; CARVALHO-SANTOS, Z.; FRANCISCO, A. P.; FIOREZE, G. T.; ANJOS, M.; BALTAZAR, C.; ELIAS, A. P.; ITSKOV, P. M.; PIPER, M. D. W.; RIBEIRO, C. Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. **PLoS Biology**, v. 15, n. 4, p. 1–29, 2017.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 697-743, 2007.

LIM, Y. W.; KIM, J. J.; LU, M.; BREUIL, C. Determining fungal diversity on *Dendroctonus ponderosae* and *Ips pini* affecting lodgepole pine using cultural and molecular methods. **Fungal Diversity**, v. 19, p. 79–94, 2005.

LIMA, H. M. A. **Criação de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) em dietas artificiais e controle utilizando fungos entomopatogênicos**. 96f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2014.

LIMA, H. M. A.; RODRIGUES, V. M.; SABINO, A. R.; SANTOS, M. Q. C.; LIMA, I. S.; DUARTE, A. G.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; SILVA, J. M. Effect of isolates of entomopathogenic fungi in the coconut eye borer. **Comunicata Scientiae Horticultural Journal**, v. 11, n. e3300, p. 1–6, 2020.

LÖHR, B.; VÁSQUEZ-ORDÓÑEZ, A. A.; LOPEZ-LAVALLE, L. A. B. *Rhynchophorus palmarum* in disguise: undescribed polymorphism in the “black” palm weevil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

LUO, C.; LI, Y.; CHEN, Y.; FU, C.; LONG, W.; XIAO, X.; LIAO, H.; YANG, Y. Bamboo lignocellulose degradation by gut symbiotic microbiota of the bamboo snout beetle *Cyrtotrachelus buqueti*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 70, 2019.

MA et al. *Proteus mirabilis* interkingdom swarming signals attract blow flies. **The ISME Journal**, v. 6, n. 7, p. 1356-1366, 2012.

MACLEOD, A.; HUSSEIN, M. Economic and social impacts of *Rhynchophorus ferrugineus* and *Paysandisia archon* on palms. In: SOROKER, V.; COLAZZA, S. (eds). **Handbook of major palm pests: biology and management**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 54–68, 2016.

MAGALHÃES, J. A. S.; MORAES NETO, A. H. A. DE; MIGUENS, F. C. Nematodes of *Rhynchophorus palmarum*, L. (Coleoptera: Curculionidae), vector of the red ring disease in coconut plantations from the north of the Rio de Janeiro State. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1281–1287, 2008.

MANFREDI, A. P.; PEROTTI, N. I.; MARTÍNEZ, M. A. Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1384–1393, 2015.

MANZANO-MARÍN, A.; LATORRE, A. Settling down: the genome of *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara tujafilina* zooms in on the process of accommodation to a cooperative intracellular life. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 7, p. 1683-1698, 2014.

MARTENS, E. C.; NEUMANN, M.; DESAI, M. S. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 457-470, 2018.

MARTÍNEZ, L. C.; PLATA-RUEDA, A.; RODRÍGUEZ-DIMATÉ, F. A.; CAMPOS, J. M.; SANTOS, V. C. DOS; ROLIM, G. D. S.; FERNANDES, F. L.; SILVA, W. M.;

WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Exposure to insecticides reduces populations of *Rhynchophorus palmarum* in oil palm plantations with bud rot disease. **Insects**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2019.

MARTÍNEZ-SOLÍS, M.; COLLADO, M. C.; HERRERO, S. Influence of diet, sex, and viral infections on the gut microbiota composition of *Spodoptera exigua* caterpillars. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–11, 2020.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014**. 1ª. ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 51 p. 2014.

MCFARLANE, M. et al. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2994, 2014.

MCMENIMAN, C. J.; LANE, R. V.; CASS, B. N.; FONG, A. W. C.; SIDHU, M.; WANG, Y. F.; O'NEILL, S. L. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 141-144, 2009.

MEDINA, V.; SARDOY, P. M.; SORIA, M.; VAY, C. A.; GUTKIND, G. O.; ZAVALA, J. A. Characterized non-transient microbiota from stinkbug (*Nezara viridula*) midgut deactivates soybean chemical defenses. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200161, 2018.

MENG, F.; BAR-SHMUEL, N.; SHAVIT, R.; BEHAR, A.; SEGOLI, M. Gut bacteria of weevils developing on plant roots under extreme desert conditions. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

MERIGGI, N.; PAOLA, M. DI; VITALI, F.; RIVERO, D.; CAPPÀ, F.; TURILLAZZI, F.; GORI, A.; DAPPORTO, L.; BEANI, L.; TURILLAZZI, S.; CAVALIERI, D. *Saccharomyces cerevisiae* induces immune enhancing and shapes gut microbiota in social wasps. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2320, p. 1–14, 2019.

MILANO, H. S. **Identificação de microrganismos de trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol**. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2012.

MILOSAVLJEVIC, I.; HODDLE, C. D.; MAFRA-NETO, A.; GÓMEZ-MARCO, F.; HODDLE, M. S. Effects of food bait and trap type on captures of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) and trap bycatch in Southern California. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 5, p. 2407-2417, 2020.

MIYAMOTO, J.; HASEGAWA, S.; KASUBUCHI, M.; ICHIMURA, A.; NAKAJIMA, A.; KIMURA, I. Nutritional signaling via free fatty acid receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 450, 2016.

- MOHAMMED, W. S.; ZIGANSHINA, E. E.; SHAGIMARDANOVA, E. I.; GOGOLEVA, N. E.; ZIGANSHIN, A. M. Comparison of intestinal bacterial and fungal communities across various xylophagous beetle larvae (Coleoptera: Cerambycidae). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- MOLIN, I. L. D.; BARRETO, M. R. Ocorrência e controle de Curculionidae em *Cocos nucifera* L. em Sinop, Mato Grosso. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 53–64, 2012.
- MONTAGNA, M. et al. Effects of the diet on the microbiota of the red palm weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–22, 2015.
- MORALES-JIMÉNEZ, J.; LEÓN, A. V. P.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, A. G.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ZÚNIGA, G.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). **Microbial Ecology**, v. 66, n. 1, p. 200-210, 2013.
- MORALES-JIMÉNEZ, J.; ZÚÑIGA, G.; RAMÍREZ-SAAD, H. C.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 1, p. 268–278, 2012.
- MORAN, N. A.; BAUMANN, P. Bacterial endosymbionts in animals. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n.3, p. 270-275, 2000.
- MORIYAMA, M.; NIKOH, N.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. Riboflavin provisioning underlies *Wolbachia*'s fitness contribution to its insect host. **mBio**, v. 6, n. 6, p. e01732-15, 2015.
- MOTA, F. F.; CASTRO, D. P.; VIEIRA, C. S.; GUMIEL, M.; ALBUQUERQUE, J. P. DE; CARELS, N.; AZAMBUJA, P. *In vitro* trypanocidal activity, genomic analysis of isolates, and in vivo transcription of type VI secretion system of *Serratia marcescens* belonging to the microbiota of *Rhodnius prolixus* digestive tract. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3205, p. 1–17, 2019.
- MOURA, J. I. L.; TOMA, R.; SGRILLO, R. B.; DELABIE, J. H. C. Natural efficiency of parasitism by *Billaea rhynchophorae* (Blanchard) (Diptera: Tachinidae) for the control of *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 273–274, 2006.
- MOURA, J. I. L.; VILELA, E. F. **Pragas do coqueiro e dendezeiro**. 2ed. Viçosa: Aprenda fácil. p. 47- 53, 1998.
- MOYA-MURILLO, O. M.; ALDANA-DE LA TORRE, R. C.; BUSTILLO-PARDEY, A. E. Eficacia de trampas para capturar *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae) en plantaciones de palma de aceite. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 41, n. 1, p. 18–23, 2015.

MRAMBA, F.; BROCE, A.; ZUREK, L. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 3, p. 671-673, 2006.

MUHAMMAD, A.; FANG, Y.; HOU, Y.; SHI, Z. The gut entomotype of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae) and their effect on host nutrition metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2291, p. 1-15, 2017.

MUHAMMAD, A.; HABINEZA, P.; JI, T.; HOU, Y.; SHI, Z. Intestinal microbiota confer protection by priming the immune system of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 1303, p. 1-13, 2019.

MÜLLER, F. A. **Microbiota intestinal de larvas e adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae): diversidade e efeito do alimento**. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; LANDERO-TORRES, I.; LEYVA-OVALLE, O. R.; GALINDO-TOVAR, M. E.; LLARENA-HERNÁNDEZ, R. C.; PRESA-PARRA, E.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M. A. Efficacy and cost of trap–bait combinations for capturing *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in ornamental palm polycultures. **Neotropical Entomology**, v. 47, n. 2, p. 302–310, 2018.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

NARDI, J. B.; MACKIE, R. I.; DAWSON, J. O. Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 8, p. 751–763, 2002.

NASCIMENTO, S. M. C.; NAKASONE, A. K.; OLIVEIRA NETO, C. F.; ALVES, K. F.; ALENCAR SOBRINHO, R. S.; CONCEIÇÃO, S. S.; CAMPOS, K. R. DE A.; CARVALHO, E. DE A. Patogenicidade e caracterização de *Thielaviopsis ethacetica* em palma de óleo. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 3, p. 236–241, 2020.

NAVARRO, D. M. DO A. F.; MURTA, M. M.; DUARTE, A. G.; LIMA, I. S. DE; NASCIMENTO, R. R. DO; SANT'ANA, A. E. G. Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro: análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 32–36, 2002.

NEGRISOLI JR, A. S.; SILVA, E. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B.; SANTOS, N. L.; GUZZO, E. C. **Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas**. Comunicado Técnico – EMBRAPA, Aracaju, SE, dezembro, 2011. n.116, 6p.

NEGRISOLI JUNIOR, A. S. N.; SILVA, E. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B. **Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas.** Belém - PA: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011.

NI, J.; TOKUDA, G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 838-850, 2013.

ORLANDO, B.; GRIGNON, G.; VITRY, C.; KASHEFIFARD, K.; VALADE, R. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. **Mycotoxin Research**, v. 35, n. 4, p. 369–380, 2019.

OZBAYRAM, E. G.; KLEINSTEUBER, S.; NIKOLAUSZ, M. Biotechnological utilization of animal gut microbiota for valorization of lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 489–508, 2020.

PALKOVA, Z. Multicellular microorganisms: Laboratory versus nature. **EMBO Reports**, v. 5, n. 5, p. 470–476, 2004.

PALMA, G.; NADAL, I.; COLLADO, M. C.; SANZ, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 8, p. 1154-1160, 2009.

PAMPLONA, V. M. S. **Distribuição espacial, amostragem sequencial e dinâmica populacional de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) na cultura de palma de óleo.** 81f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

PAN, X.; ZHOU, G.; WU, J.; BIAN, G.; LU, P.; RAIKHEL, A. S.; XI, Z. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. 23-31, 2012.

PARRA, D.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; PINEDA, J.; GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn em el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleóptera: Curculionidae). **Entomotropica**, v. 18, n. 1, p. 49 - 55, 2003.

PERUCHI, A. **Distribuição espacial, amostragem sequencial e dinâmica populacional de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) na cultura de palma de óleo.** 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PESSIONE, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. 86, p. 1–15, 2012.

PETERSON, B. F.; SCHARF, M. E. Lower termite associations with microbes: Synergy, protection, and interplay. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 422, p. 1–7, 2016.

PINHO, R. C.; FARIAS, P. R. S.; RODRIGUES, K. C. V.; TINÔCO, R. S.; SANTOS, A. V. F. DOS; MARSSENA, R. T. P. Distribuição espacial de *Rhynchophorus palmarum* em palma de óleo no Estado do Pará, Amazônia. **Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 1, p. 22–31, 2016.

PINTO, C. A digestão dos insetos mastigadores: fisiologia e potencial uso no manejo integrado de pragas (MIP). **Biológico**, v. 81, n. 1, p. 1–13, 2019.

PIRES, M. D. E. M.; COSTA, R. S.; REBOUÇAS, A.; JOSÉ, S. Ã. O.; BADARÓ, M. M.; MIDDLEJ, C.; ALVES, J. M. A cultura do coco: uma análise econômica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 173–176, 2004.

PLATA-RUEDA, A.; MARTÍNEZ, L. C.; FERNANDES, F. L.; SOUSA RAMALHO, F. DE; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Interactions between the bud rot disease of oil palm and *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 962–965, 2016.

POTHULA, R.; SHIRLEY, D.; PERERA, O. P.; KLINGEMAN, W. E.; OPPERT, C.; ABDELGAFFAR, H. M. Y.; JOHNSON, B. R.; JURAT-FUENTES, J. L. The digestive system in *Zygentoma* as an insect model for high cellulase activity. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212505, 2019.

PRIYA, N. G.; OJHA, A.; KAJLA, M. K.; RAJ, A. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.

PRZEMIENIECKI, S. W.; KOSEWSKA, A.; CIESIELSKI, S.; KOSEWSKA, O. Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113265, 2020.

PUMPUNI, C. B.; BEIER, M. S.; NATARO, J. P.; GUERS, L. D.; DAVIS, J. R. *Plasmodium falciparum*: Inhibition of Sporogonic Development in *Anopheles stephensi* by Gram-negative bacteria. **Experimental Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 195-199, 1993.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.

RAYMANN, K.; COON, K. L.; SHAFFER, Z.; SALISBURY, S.; MORAN, N. A. Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees. **mBio**, v. 9, n. 5, p. 1-15, 2018.

RICCI, I.; VALZANO, M.; ULISSI, U.; EPIS, S.; CAPPELLI, A.; FAVIA, G. Symbiotic control of mosquito borne disease. **Pathogens and Global Health**, v. 106, n. 7, p. 380-385, 2012.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v. 38, n. 1, p. 525–552, 2004.

RINKE, R. **Comparação da diversidade microbiana intestinal em larvas do campo e laboratório do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Cucurilionidae)** 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

RODRÍGUEZ, C.; OEHLISCHLAGER, A. C.; CHINCHILLA, C. M. Examination of critical components of *Rhynchophorus palmarum* pheromone traps. **ASD Oil Palm Pap**, v. 46, p. 15–19, 2016.

ROMERO, S.; NASTASA, A.; CHAPMAN, A.; KWONG, W. K.; FOSTER, L. J. The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. **Insect Molecular Biology**, v. 28, n.4, p. 455-472, 2019.

ROSADO, G. L. **Composição da comunidade microbiana do intestino médio e caracterização cinética de proteases intestinais de *Anticarsia gemmatilis* alimentadas com diferentes genótipos de soja**. 83 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

ROUZÉ, R.; MONÉ, A.; DELBAC, F.; BELZUNCES, L.; BLOT, N. The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. **Microbes and Environments**, v. 34, n. 3, p. 226-233, 2019.

RUSSELL, J. A.; DUBILIER, N.; RUDGERS, J. A. Nature's microbiome: introduction. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 1225-1237, 2014.

RYU, J. H. et al. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. **Science**, v.319, n.5864, p. 777-781, 2008.

SABINO, A. R. **Utilização de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) e inseticidas botânicos visando ao controle de adultos de *Rhynchophorus palmarum* L. 1764 (Coleoptera: Curculionidae)**. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo – AL, 2014.

SAHOO, N. K.; PAKSHIRAJAN, K.; GHOSH, P. K.; GHOSH, A. Biodegradation of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6: effect of culture conditions and degradation kinetics. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 275-286, 2011.

SALEM, H.; BAUER, E.; STRAUSS, A. S.; VOGEL, H.; MARZ, M.; KALTENPOTH, M. Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1796, p. 1-10, 2014.

SÁNCHEZ, P. A.; CERDA, H. El complejo *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) - *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Tylenchida: Aphelenchoididae), en palmeras. **Boletín de Entomología Venezolana**, v. 8, p. 1-18, 1993.

SANCHEZ-CONTRERAS, M.; VLISIDOU, I. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, n. 1, p. 203–244, 2008.

SÁNCHEZ-SOTO, S.; NAKANO, O. Registro de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no estado de Mato Grosso do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 4, p. 659–660, 2002.

SANTANA, C. C.; BARBOSA, L. A.; BASÍLIO JÚNIOR, I. D.; NASCIMENTO, T. G. DO; DORNELAS, C. B.; GRILLO, L. A. M. Lipase activity in the larval midgut of *Rhynchophorus palmarum*: Biochemical characterization and the effects of reducing agents. **Insects**, v. 8, n. 3, p. 1–7, 2017.

SANTOS, A. F.; INÁCIO, C. A.; GUEDES, M. V.; TOMAZ, R. First report of *Thielaviopsis paradoxa* causing stem rot in *Dracaena marginata* in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, p. 345-346, 2012.

SANTOS, S. **Efeito de produtos fitossanitários sobre larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., 1764 (Coleoptera: Curculionidae) em laboratório**. 41f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2016.

SARANGI, A. N.; GOEL, A.; AGGARWAL, R. Methods for studying gut microbiota: a primer for physicians. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 62-73, 2019.

SCHMIDTBERG, H.; SHUKLA, S. P.; HALITSCHKE, R.; VOGEL, H.; VILCINSKAS, A. Symbiont-mediated chemical defense in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 1715–1729, 2019.

SCHOLLENBERGER, M.; MÜLLER, H.-M.; RÜFLE, M.; TERRY-JARA, H.; SUCHY, S.; PLANK, S.; DROCHNER, W. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 142–146, 2007.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 119-125, 2001.

SHAO, Y.; ARIAS-CORDERO, E.; GUO, H.; BARTRAM, S.; BOLAND, W. *In vivo* Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85948, 2014.

SHENG, P.; HUANG, S.; WANG, Q.; WANG, A.; ZHANG, H. Isolation, screening, and optimization of the fermentation conditions of highly cellulolytic bacteria from the hindgut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 270–284, 2012.

SHI, Z.; WANG, L.; ZHANG, H. Low diversity bacterial community and the trapping activity of metabolites from cultivable bacteria species in the female reproductive

system of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6266–6278, 2012.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: 2ª Ed. Guanabara Koogan. 2010.

SILVA, T. L.; TOFFANO, L.; FERNANDES, J. B.; GRAÇAS FERNANDES DA SILVA, M. F. DAS; SOUSA, L. R. F. DE; VIEIRA, P. C. Mycotoxins from *Fusarium proliferatum*: new inhibitors of papain-like cysteine proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1169–1175, 2020.

SILVA, T. P.; ALBUQUERQUE, F. S.; SANTOS, C. W.; FRANCO, M.; CAETANO, L. C.; PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 263-269, 2018.

SLEATOR, R. D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p.361-366, 2008.

SNYDER, A. K.; RIO, R. V. M. “*Wigglesworthia morsitans*” folate (vitamin B9) biosynthesis contributes to tsetse host fitness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5375–5386, 2015.

SNYMAN, M.; GUPTA, A. K.; BEZUIDENHOUT, C. C.; CLAASSENS, S.; BERG, J. VAN DEN. Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 115, p. 1–9, 2016.

SOBRAL, K. M. B.; QUEIROZ, M. A. DE; NETO, I. D. S. L.; OLIVEIRA, R. S. DE; RAMOS, S. R. R. Is there genetic variability in dwarf coconut accessions preserved in Brazil? **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 52–61, 2019.

STEFANINI, I.; DAPPORTO, L.; BERNÁ, L.; POLSINELLI, M.; TURILLAZZI, S.; CAVALIERI, D. Social wasps are a *Saccharomyces* mating nest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 8, p. 2247–2251, 2016.

STENBERG, J. A. A conceptual framework for integrated pest management. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 9, p. 759-769, 2017.

SU, L.-J.; LIU, H.; LI, Y.; ZHANG, H.-F.; CHEN, M.; GAO, X.-H.; WANG, F.-Q.; SONG, A.-D. Cellulolytic activity and structure of symbiotic bacteria in locust guts. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 7926–7936, 2014.

SUGIO, A.; DUBREUIL, G.; GIRON, D.; SIMON, J. C. Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 2, p. 467-478, 2015.

SUMANO, D.; SÁNCHEZ, S.; ROMERO, J.; SOL, A. Eficacia de captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae) con diferentes diseños de trampas en Tabasco, México. **Fitosanidad**, v.16, n. 1, p. 43–48, 2012.

SUN, Z. et al. Effects of BmCPV infection on silkworm *Bombyx mori* intestinal bacteria. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146313, 2016.

TAGLIAVIA, M.; MESSINA, E.; MANACHINI, B.; CAPPELLO, S.; QUATRINI, P. The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). **BMC Microbiology**, v. 14, n. 136, p. 1-11, 2014.

TAKADA, H. M.; BATISTA FILHO, A.; HOJO, H. Aspectos biológicos de *Rhynchophorus palmarum*, 1764 (Coleoptera: Curculionidae) em banana-prata (*Musa sapientum*). **Biológico**, v. 76, n. 1, p. 35–39, 2014.

TANG, X.; FREITAK, D.; VOGEL, H.; PING, L.; SHAO, Y.; CORDERO, E. A.; ANDERSEN, G.; WESTERMANN, M.; HECKEL, D. G.; BOLAND, W. Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous Lepidopteran larvae. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e36978, 2012.

TETREAU, G.; WANG, P. Chitinous structures as potential targets for insect pest control. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1142, p. 273–292, 2019.

THONGEKKAEW, J.; KHUMSAP, A.; CHATSA-NGA, P. Yeasts in mixed deciduous forest areas of phujong nayoy national park and their ability to produce xylanase and carboxymethyl cellulase. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 34, n. 2, p. 157–163, 2012.

TOKUDA, G.; MIKAELIAN, A.; FUKUI, C.; MATSUURA, Y.; WATANABE, H.; FUJISHIMA, M.; BRUNE, A. Fiber-associated spirochetes are major agents of hemicellulose degradation in the hindgut of wood-feeding higher termites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 51, p. 11996–12004, 2018.

TOROVIC, L. *Fusarium* toxins in corn food products: a survey of the Serbian retail market. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 8, p. 1596-1609, 2018.

TREGGAR, J. W.; RIVAL, A.; PINTAUD, J. C. A family portrait: unravelling the complexities of palms. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1387–1389, 2011.

TREMACOLDI, C. R.; LINS, P. M. P. **Inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Thielaviopsis paradoxa* com a utilização de fungicidas sistêmicos e de contato.** Belém - PA: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011.

TSEGAYE, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Isolation and characterization of novel lignolytic, cellulolytic, and hemicellulolytic bacteria from wood-feeding termite *Cryptotermes brevis*. **International Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 29–39, 2019.

UPADHYAYA, S. K.; MANANDHAR, A.; MAINALI, H.; POKHREL, A. R.; RIJAL, A.; PRADHAN, B.; KOIRALA, B. Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from gut of termite. **Rentech Symposium Compendium**, v. 1, p.14-18, 2012.

VALZANO, M.; ACHILLE, G.; BURZACCA, F.; DAMIANI, C.; SCUPPA, P.; RICCI, I.; FAVIA, G. Deciphering microbiota associated to *Rhynchophorus ferrugineus* in Italian samples: a preliminary study. **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 44, n. 16, p. 85–89, 2012.

VAN SCHOOTEN, B.; GODOY-VITORINO, F.; MCMILLAN, W. O.; PAPA, R. Conserved microbiota among young *Heliconius* butterfly species. **PeerJ**, v.6, n. e5502, p. 1-18, 2018.

VERDE, G. L.; TORTA, L.; MONDELLO, V.; CALDARELLA, C. G.; BURRUANO, S.; CALECA, V. Pathogenicity bioassays of isolates of *Beauveria bassiana* on *Rhynchophorus ferrugineus*. **Pest Management Science**, v. 71, n. 2, p. 323-328, 2015.

VILANOVA, C.; BAIXERAS, J.; LATORRE, A.; PORCAR, M. The generalist inside the specialist: gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1005, p. 1–8, 2016.

VISÔTTO, L. E. **Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) e caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao seu trato intestinal.** 110f. Tese. (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

VOIROL, L. R. P.; FRAGO, E.; KALTENPOTH, M.; HILKER, M.; FATOUROS, N. E. Bacterial symbionts in Lepidoptera: Their diversity, transmission, and impact on the host. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 556, p. 1–14, 2018.

WANG, S.; WANG, L.; FAN, X.; YU, C.; FENG, L.; YI, L. An insight into diversity and functionalities of gut microbiota in insects. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 1976–1986, 2020.

WARNECKE, F. et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, p. 560–565, 2007.

WARWICK, D. R. N.; PASSOS, E. E. M. Ataque de resinose do coqueiro causada por *Thielavopsis paradoxa* em Sergipe, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 175-177, 2009.

WARWICK, D. R. N.; TALAMINI, V. Doenças e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. In: CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M. et al. (Ed.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. p. 157-190.

WENZEL, M.; SCHONIG, I.; BERCHTOLD, M.; KAMPFER, P.; KONIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 32–40, 2002.

WERNEGREEN, J. J. Mutualism meltdown in insects: bacteria constrain thermal adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 255-262, 2012.

WIELKOPOLAN, B.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. **Planta**, v. 244, n. 2, p. 313–332, 2016.

WONG, A. C. N.; LUO, Y.; JING, X.; FRANZENBURG, S.; BOST, A.; DOUGLAS, A. E. The host as the driver of the microbiota in the gut and external environment of *Drosophila melanogaster*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6232–6240, 2015.

XIA, X.; SUN, B.; GURR, G. M.; VASSEUR, L.; XUE, M.; YOU, M. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 25, p. 1–10, 2018.

XU, B.; XU, W.; LI, J.; DAI, L.; XIONG, C.; TANG, X.; YANG, Y.; MU, Y.; ZHOU, J.; DING, J.; WU, Q.; HUANG, Z. Metagenomic analysis of the *Rhinopithecus bieti* fecal microbiome reveals a broad diversity of bacterial and glycoside hydrolase profiles related to lignocellulose degradation. **BMC Genomics**, v. 16, n. 174, p. 1-11, 2015.

XU, D.; XU, L.; ZHOU, F.; WANG, B.; WANG, S.; LU, M.; SUN, J. Gut bacterial communities of *Dendroctonus valens* and monoterpenes and carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* at different attack densities to host pines. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1251, p. 1–9, 2018.

YAPI, D. Y. A.; GNAKRI, D.; NIAMKE, S. L.; KOUAME, L. P. Purification and biochemical characterization of a specific β -glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2009.

YUN, J. H. et al. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5254–5264, 2014.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, A. S.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. **Compêndio de micologia médica**. 2^a ed. São Paulo: Médica e Científica, 2010.

ZHANG, C.R.; SHAN, H.W.; XIAO, N.; ZHANG, F.D.; WANG, X.W.; LIU, Y.Q.; LIU, S.S. Differential temporal changes of primary and secondary bacterial symbionts and whitefly host fitness following antibiotic treatments. **Scientific Reports**, v. 5, n. 15898, p. 1-12, 2015.

ZHANG, S.; SHU, J.; XUE, H.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; FANG, L.; WANG, Y.; WANG, H. The gut microbiota in camellia weevils are influenced by plant secondary metabolites and contribute to saponin degradation. **mSystems**, v. 5, n. 2, p. e00692-19, 2020.

ZHANG, Z.; JIAO, S.; LI, X.; LI, M. Bacterial and fungal gut communities of *Agrilus mali* at different developmental stages and fed different diets. **Scientific Reports**, v. 8, n. 15634, p. 1–11, 2018.

ZHAO, H.; LOVETT, B.; FANG, W. Chapter Five - Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 137-163, 2016.

ZHAO, Y.; WANG, W.; ZHU, F.; WANG, XIAOYUN; WANG, XIAOPING; LEI, C. The gut microbiota in larvae of the housefly *Musca domestica* and their horizontal transfer through feeding. **AMB Express**, v. 7, n. 147, p. 1–9, 2017.

ZHENG, H.; PERREAU, J.; ELIJAH POWELL, J.; HAN, B.; ZHANG, Z.; KWONG, W. K.; TRINGE, S. G.; MORAN, N. A. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 51, p. 25909–25916, 2019.

ZHOU, H.; GUO, W.; XU, B.; TENG, Z.; TAO, D.; LOU, Y.; GAO, Y. Screening and identification of lignin-degrading bacteria in termite gut and the construction of LiP-expressing recombinant *Lactococcus lactis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 63–69, 2017.

ZIGANSHINA, E. E.; MOHAMMED, W. S.; SHAGIMARDANOVA, E. I.; VANKOV, P. Y.; GOGOLEVA, N. E.; ZIGANSHIN, A. M. Fungal, bacterial, and archaeal diversity in the digestive tract of several beetle larvae (coleoptera). **BioMed Research International**, v. 2018, n. 6765438, p. 1–15, 2018.

APÊNDICE

Meios de cultura utilizados:

❖ Caldo BHI

Infuso cérebro-coração.....	17,5 g
Peptona.....	10,0 g
Dextrose.....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato dissódico.....	2,5 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ Ágar Sangue

Peptona de caseína (bovina).....	15,0 g
Peptona de soja.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Sangue (carneiro).....	50 mL
Ágar bacteriológico.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ Ágar Nutriente

Extrato de carne.....	1,0 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
Peptona.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar bacteriológico.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ Ágar Triptona de Soja

Triptona.....	15, g
Digestão papaica de soja.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar bacteriológico.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ **Ágar MacConkey**

Peptona de caseína.....	1,5 g
Peptona de carne.....	1,5 g
Peptona de gelatina.....	17,0 g
Sais biliares.....	1,5 g
Lactose.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Vermelho neutro.....	0,03 g
Cristal violeta.....	0,001 g
Ágar bacteriológico.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ **Ágar Sabouraud Dextrose**

Dextrose.....	40,0 g
Peptona.....	10,0 g
Ágar bacteriológico.....	15,0 g
Cloranfenicol.....	0,05 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ **Ágar Batata Dextrose**

Infusão de amido de batata.....	4,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

❖ **Ágar Lactrimel**

Leite em pó.....	20,0 g
Mel.....	10,0 g
Farinha de trigo.....	20,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL