

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA**

JOSÉ CARLOS BIANCHINI JÚNIOR

**EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Ricinus communis* L. SOBRE
ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS

2021

JOSÉ CARLOS BIANCHINI JÚNIOR

**EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Ricinus communis* L. SOBRE
ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis***

**HEXANIC EXTRACT EFFECT FROM *Ricinus communis* L. ON *Bacillus
thuringiensis* SPORES**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva.

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JOSÉ CARLOS BIANCHINI JÚNIOR

**EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Ricinus communis* L. SOBRE
ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis***

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação, apresentado como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em
Agronomia da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi
Lozano da Silva.

Data de aprovação: 23 de novembro de 2021

Everton Ricardi Lozano da Silva
Doutor
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Jheniffer Valmira Warmling
Doutora
Universidade Estadual de Londrina (UEL) - PR

Paula Fernandes Montanher
Doutorando
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**DOIS VIZINHOS
2021**

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha eterna gratidão.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano, pela sabedoria, paciência e muitos ensinamentos, no qual me guiou nesta trajetória desde as minhas iniciações científicas até a conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas que foram base de toda a minha estrutura emocional. Mesmo aqueles que de longe, faziam questões de realizarem ligações, vídeo chamadas, áudios e fotos. Obrigado por me permitir ser digno de nossa amizade. Reservei a cada de um de vocês um espaço de gratidão em meu peito, desejando muito sucesso em nossas jornadas.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, em especial ao meu pai, irmãos, primas e primos e as minhas tias de consideração e de sangue. E claro a minha mãe que mesmo não estando fisicamente presente para prestigiar ao meu lado, estará sempre iluminando o meu coração aonde eu estiver, pois acredito que sem o apoio de cada um deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa, fica registrado o meu muito obrigado!!!

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”.

RESUMO

Nos sistemas biológicos e alternativos de produção, são utilizados produtos à base de plantas, como de óleos essenciais, extratos vegetais, bem como microrganismos entomopatogênicos, dentre os quais *Bacillus thuringiensis* (Bt). Tais agentes podem ser aplicados separadamente ou associados para o controle de insetos-pragas, podendo um interferir sobre a ação do outro. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato hexânico de mamona (*Ricinus communis*) EHRC sobre esporos de Bt. Para tal, o efeito do EHRC à 2% foi avaliado sobre esporos de Bt, simulando a aplicação conjunta. Os ensaios com esporos foram realizados *in vitro*, a partir das concentrações de 1×10^{-6} UFC/mL de cada produto a base de Bt (Crystal[®], Dipel[®] e Xentari[®]). Uma alíquota de 60 µL dessa suspensão foi adicionada em frascos de Erlenmeyer, contendo 10 mL da solução de EHRC à 2%. Posteriormente a mistura foi inoculada em três placas-de-Petri, em sete pontos na superfície de cultura ágar nutrientes, e em seguida, quantificado a UFC/mL por ponto. Observou que o EHRC à 2% reduziu as UFC/mL de Bt em todos os tratamentos, comparando-se às respectivas testemunhas, variando de 27,18% a 93,18%. Logo o EHRC à 2% não é compatível com os esporos de Bt dos produtos comerciais Crystal[®], Dipel[®] e Xentari[®].

Palavras-chaves: Mamona, planta inseticida, compatibilidade, bactéria entomopatogênica

ABSTRACT

In biological and alternative production systems, plant-based products are used, such as essential oils, plant extracts, as well as entomopathogenic microorganisms, including *Bacillus thuringiensis* (Bt). Such agents can be applied separately or combined to control insect-pests, one of which may interfere with the action of the other. In this sense, the objective of this work was to evaluate the effects of the hexane extract of castor bean (*Ricinus communis*) EHRC on Bt spores. For such, the effect of EHRC at 2% was evaluated on Bt spores, simulating the joint application. Tests with spores were performed *in vitro*, from concentrations of 1×10^{-6} CFU/mL of each Bt-based product (Crystal[®], Dipel[®] and Xentari[®]). An aliquot of 60 μ L of this suspension was added to Erlenmeyer flasks, containing 10 mL of the 2% EHRC solution. Subsequently, the mixture was inoculated in three Petri dishes, at seven points on the nutrient agar culture surface, and then the CFU/mL per point was quantified. It was observed that the EHRC at 2% reduced the CFU/mL of Bt in all treatments, compared to the respective controls, ranging from 27.18% to 93.18%. Therefore 2% EHRC is not compatible with Bt spores from commercial products Crystal[®], Dipel[®] and Xentari[®].

Keywords: Castor bean, insecticide plant, compatibility, entomopathogenic bacteria.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 EXTRATOS BOTÂNICOS UMA FERRAMENTA NO CONTROLE ALTERNATIVO | 11 |
| 2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> UMA FERRAMENTA DE SUCESSO NO CONTROLE BIOLÓGICO | 13 |
| 2.3 ASSOCIAÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E EXTRATOS VEGETAIS SOBRE INSETOS-PRAGAS | 15 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 APLICAÇÃO CONJUNTA: PRODUTOS A BASE DE <i>B. thuringiensis</i> ASSOCIADOS AO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>Ricinus communis</i> | 17 |
| 4.1.1 Efeito do extrato hexânico de <i>R. communis</i> sobre esporos de <i>B. thuringiensis</i> | 17 |
| 4.2 ANÁLISE MATEMÁTICA E ESTATÍSTICA | 20 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 26 |
| REFERÊNCIAS | 27 |

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola no Brasil vem crescendo gradativamente com ao passar dos anos, visto que o país é reconhecido mundialmente pelo agronegócio, por possuir vocação de ampla diversidade e características edafoclimáticas favoráveis na sua expansão. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), destaca-se que o país aumente sua produção agropecuária em 40% até final 2021. Para a obtenção e manutenção deste alto nível de produção é necessária utilização de defensivos agrícolas no controle das pragas, já que as mesmas podem provocar diversos danos a produtividade caso a plantação não esteja devidamente protegida (AGROLINK, 2021).

Para o controle dessas pragas são empregadas elevadas quantidades de inseticidas químicos sintéticos. Entretanto o uso de produtos naturais como extratos vegetais, caldas e óleos essenciais vem se tornando ferramentas mitigadoras ao impacto no meio ambiente e como estratégia no controle de pragas. Da mesma forma tem-se o controle biológico, fenômeno natural, que envolve mecanismos em que uma população é regulada por outra população, ou seja, um ser um inseto sendo explorado por outro inseto, controlando o crescimento populacional, e assim mantendo equilíbrio do meio (PARRA, et al., 2002).

Comercialmente já existem diversos produtos à base de bactérias, fungos, vírus e produtos oriundos de vegetais, registrados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (AGROFIT, 2021). Dentre tais produtos, destacam-se os produtos à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para o controle de lepidópteros-praga (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Outro agente de controle importante e que vem ganhando espaço na gama de produtos utilizados para o controle de insetos-praga são os extratos vegetais. Estes possuem em sua composição os metabólitos secundários, que podem agir sobre os insetos causando alterações no sistema hormonal, deformações no processo da ecdise, mortalidade nas diversas fases de desenvolvimento, inibição do consumo alimentar e quando submetidos sobre bactérias ocasiona ação antimicrobiana (ISMAN 2006; SILVA et al., 2012).

O uso de produtos naturais, seja a base de micro-organismos, vegetais ou associados, são importantes ferramentas que se enquadram nas perspectivas do Manejo Integrado de Pragas (MIP). De acordo com Saito & Luchini (1998) produtos à base de extratos vegetais, em concentrações adequadas, podem ser usados em associação com

produtos entomopatogênicos, obtendo-se efeitos aditivos ou sinérgicos, quando submetido um sobre o outro. Capalbo (2005) salienta que os produtos à base de bactérias e extratos vegetais podem ser utilizados individualmente, concomitantemente ou associados, visando o controle de insetos-praga, sobretudo na ocorrência de diferentes espécies de insetos em diferentes fases da vida. Os modos de ação entre os dois agentes de controle, podem apresentar efeitos aditivos como maior eficiência, virulência, patogenicidade ao entrar em contato com o alvo, ou negativo, comprometendo a ação do micro-organismo.

Nesse sentido de associação de agentes de controle, destaca-se trabalho realizado por Singh et al. (2007), em que testou-se a eficiência do uso de azadirachtina em associação ao *Bacillus thuringiensis* em três diferentes concentrações (CL₂₀, CL₅₀ e CL₉₅). De acordo com os autores, verificou-se uma ação satisfatória desta associação, ou seja, resultando em efeitos aditivos sobre os esporos da bactéria. Ainda, os mesmos destacam que essa combinação pode ser útil para controlar populações de insetos-pragas que venham a apresentar resistência ao Bt, à medida que podem não sobreviver ao efeito da mistura.

Em estudo semelhante, foram avaliados os óleos essenciais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* Jacq.) (Magnoliopsida: Piperaceae) e cravo da índia (*Syzygium aromaticum* L.) (Magnoliopsida: Myrtaceae), nas concentrações de 30 e 50 mg/L, em associação com o produto a base de Bt (Xentari[®] WG). O óleo essencial de pimenta longa, na concentração de 50mg/L, associado ao Bt, também apresentou efeitos antagônicos sobre esporos da bactéria (CRUZ, 2012). Já em estudo realizado com extratos vegetais na concentração de 5% sobre Bt, a associação entre Bt e o extrato de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (Myrtales: Myrtaceae), pimenta (*Capsicum baccatum* L.) (Magnoliopsida: Solanaceae) e uva-do-japão (*Hovenia dulcis* T.) (Magnoliopsida: Rhamnaceae) causou efeito negativo sobre os esporos de Bt (VILANI et al., 2016). No mesmo sentido, em estudo realizado por Lozano et al. (2017), sobre a associação de produtos fitossanitários naturais e *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki S-1905, foi verificado que o efeito sobre os esporos variou conforme o produto, sendo estes positivos ou negativos.

Em virtude do exposto, a avaliação da associação de extratos vegetais e micro-organismos, como *B. thuringiensis* pode ser uma estratégia importante na descoberta de uma nova ferramenta alternativa de controle. Tais estudos se fazem necessário, tanto do ponto de vista econômico, quanto do sustentável. Assim, o objetivo deste trabalho foi

avaliar o o efeito do extrato hexânico de *R. communis*, *in vitro*, sobre esporos de *B. thuringiensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EXTRATOS BOTÂNICOS UMA FERRAMENTA NO CONTROLE ALTERNATIVO

As plantas possuem componentes orgânicos, que são divididos em metabolismos primários e secundários. Entende-se como metabolismo primário, o conjunto de processos que desempenham uma função essencial para sua sobrevivência e metabolismo secundário, aquele que não está diretamente envolvido na sobrevivência da planta, mas produzido como estratégia de defesa ao ataque de herbívoros, repelência a insetos, atração de agentes polinizadores, ação microbiana e afins. Os metabólitos secundários vêm sendo estudado, com finalidade para o uso como produtos fitossanitários no controle de pragas agrícolas (ROEL, 2001). Os inseticidas naturais destacam-se na literatura como forma alternativa no controle das pragas, sendo utilizado tanto em cultivos comerciais, como também, na agricultura biológica (ARRUDA, 1998).

Os derivados botânicos podem causar diversos efeitos sobre insetos, causando repelência, inibição de oviposição e da alimentação de insetos, alterações no sistema hormonal, deformações, infertilidade, e mortalidade nas diversas fases do ciclo de vida dos insetos (ROEL, 2001).

Em sistemas alternativos de produção, em geral, o uso de inseticidas a base de plantas, como extratos vegetais e óleos essenciais para o controle de pragas já é realizado a pelo menos dois mil anos (PEREIRA, 2018). No Brasil, o uso desse mecanismo no ramo das pesquisas e, posteriormente sobre o controle de pragas, vem crescendo gradativamente, uma vez em que o país se encontra em uma enorme biodiversidade floral (ISMAN, 2015).

Entende-se como extratos vegetais, preparações concentradas de origem orgânica, que possuem compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas, extraídos por diferentes solventes, podendo ser divididos em três grupos quimicamente distintos: Terpenos; compostos fenólicos e compostos nitrogenados (VIEGAS JUNIOR, 2002). Segundo Lozano et al. (2017) esses compostos quando associados com outros

micro-organismos, como Bt podem apresentar efeitos deletérios sobre os esporos da bactéria.

Segundo Marangoni et al. (2012) as piretrinas destacam-se como um dos principais grupos de inseticidas naturais, representado por seis ésteres com estruturas químicas oriundas das flores do piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cv. Vacaria) (Asteraceae). Outro grande exemplo de planta com potencial inseticida conhecido mundialmente é *Azadirachta indica* (Meliaceae), popularmente conhecida como nim, possuindo vários estudos comprovando seu efeito inseticida sobre mais de 400 espécies de insetos (MARTINEZ, 2002).

Dentre a diversidade de plantas com potencial inseticida, destaca-se a mamona, *Ricinus communis* L., conhecida pelos seus efeitos tóxicos, como também pela sua importância econômica na produção de biocombustível (RIZZO, 2005). Segundo Filho Savy (2005), quando consumido por animais, as folhas e sementes da mamona causam problemas gastro-intestinais e neuro-musculares, provocando sintomas de intoxicação após algumas horas ou em poucos dias por decorrência da ricina, um alcalóide extremamente tóxico encontrado em partes da planta.

Tal fato é evidenciado por Pessoa et al. (2014) que em trabalho utilizando o fruto e a semente de mamona verificaram efeito inseticida, causando, mortalidade em *Anticarsia gematallis* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e por Warmling (2018), que avaliou os efeitos letais e subletais de extratos vegetais alcoólicos a base de *R. communis* sobre *C. includens*, observando efeito inseticida.

Para a extração dos princípios ativos de plantas produtoras de metabolismo secundários, vários trabalhos abordam o uso de solventes, podendo variar conforme seu tipo (WARMLING, 2018). Para a extração desses princípios ativos pode ser utilizada várias partes da planta, como por exemplo, folhas, caules, sementes, raízes e flores (MACIEL et al., 2002).

Entre as técnicas de extração de princípios ativos de plantas, destaca-se extração sólido-líquida por maceração (SINGH, 2008), recomendada para a extração de compostos como flavonoides (SUN et al., 2011; ZHANG et al., 2011), esteróis (SUN et al., 2010), terpenos (PÉRES et al., 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011). Já a extração líquido-líquido ocorre entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), cujo sua eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Deste modo, para isolar os princípios de interesse a partir dos metabólicos secundários de uma planta, uma das técnicas utilizada por CIRILO, (1993) é a preparação de um extrato hidroalcoólico, que passa por um processo de partição líquido-líquido, a partir de solventes que apresentam polaridade crescente, como o hexano. Com este raciocínio para a realização deste trabalho, destaca-se o método utilizado conforme a dissertação de Warmling (2018).

Nesse contexto, trabalho realizado por Warmling (2018) destaca o uso de extratos botânicos hidroalcoólicos e frações purificadas de *R. communis* sobre *C. includens* em condições de laboratório, resultado com alto potencial inseticida (75%) a partir do uso da fração hexânica.

2.2 *Bacillus thuringiensis* UMA FERRAMENTA DE SUCESSO NO CONTROLE BIOLÓGICO

Face ao uso contínuo de inseticidas químicos sintéticos, que podem ocasionar danos ao meio ambiente e resistência às pragas, fez que o controle biológico de insetos-praga virasse alvo de inúmeras pesquisas. Há registros de que estudos com bactérias que apresentam potencial inseticida no controle de insetos-pragas, especificamente em áreas agrícolas, tiveram início do século XIX (FIUZA, 2010).

Dentre as espécies de bactérias, destacam-se as entomopatogênicas, sobretudo do gênero *Bacillus* que possuem alta virulência, elevada capacidade invasora e produção de toxinas, quando entram em contato com os insetos-alvo, (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). *Bacillus* spp. são bactérias aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas, Gram-positiva, pertencendo a família *Bacillaceae* podendo ser encontradas em formas individuais ou em cadeias, em substratos variáveis. Suas células possuem formato de bastonete e as condições para seu crescimento varia entre a faixa de 10 a 45°C, com temperatura ideal de 30°C (HABIB; ANDRADE, 1998).

Dentre as espécies da família *Bacillaceae*, destaca-se *Bacillus thuringiensis* (Bt), em que foi descoberto em 1902 por Ishiwata no Japão através da criação do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L. 1758) (Lepidoptera: Bombycidae). Em que, posteriormente foi estudada por Berliner, (1911) a partir de larvas da ordem Lepidoptera, tornando-se o micro-organismo mais utilizado em nível mundial para o controle de insetos-praga (FIUZA, 2010).

O modo de ação do Bt está relacionado a produção de cristais e esporos que ao entrarem em contato com o inseto-alvo, em características de pH desejável, ativa as toxinas. Tais cristais são formados por polipeptídios, sendo mais conhecidos como proteínas Cry, apresentando ação entomopatogênica em insetos da ordem Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Orthoptera, Mallopha, além de nematoides, protozoários e ácaros (CAPALBO, 2005).

Após os insetos ingerirem os cristais, estes são solubilizados em condições de pH alcalino, liberando as δ -endotoxinas, que serão ativadas por proteases intestinais e atravessam a membrana peritrófica do inseto, ligando-se, em seguida, aos receptores presentes nas microvilosidades das células epiteliais do mesêntero. Na decorrência desse processo ocorre a formação de poros na membrana celular, ocasionando um desequilíbrio iônico entre o citoplasma da célula e o seu meio externo, permitindo que os esporos atinjam a hemolinfa e germinem, levando o inseto a morte por septicemia (GILL, 1995). Quando ingeridos por insetos da ordem Lepidoptera, os cristais proteicos, juntamente com os esporos, ocasionam rupturas e paralisia do epitélio do intestino médio das lagartas, e em poucas horas, esta apresenta redução na alimentação, o que evita desfolha (MOSCARDI, 2003).

Responsável por 90 – 95% do mercado mundial de bioinseticidas, Bt se encontra como uma ferramenta de alta eficiência no controle biológico. Capalbo et al. (2005) ainda afirmam que produtos à base de Bt são os mais bem-sucedidos, utilizados em setores agropecuário, como no cultivo de grãos, áreas florestais e na saúde pública como protagonista do combate a vetores de doenças humana.

Em escala comercial Bt pode ser comercializado em forma de pó ou emulsão, possuindo características de baixo danos ao ambiente e as espécies não-alvo. Dentre os produtos à base de Bt, destaca-se o Dipel[®], como produto com maior alcance no mercado mundial no ano 2000, apresentando baixa toxicidade para algumas ordens e servindo como controle para mais de 170 lepidópteros-praga (GALZER, E; FILHO, W., 2016). A partir desse avanço várias outras empresas lançaram produtos à base de Bt sobre registro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como o Crystal[®] e Xentari[®] caracterizado por produtos da classe de inseticidas microbiológicos de baixa toxicidade ao ambiente, de formulação pó molhável, granulado dispersível, líquido ou suspensão concentrada, atuando no controle de diversas pragas agrícolas da ordem Lepidoptera, presente em diversas culturas de commodities (AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ, 2021).

De acordo com Agrofit (2021), mais de 24 produtos à base de Bt encontram-se registrados pelo MAPA e comercializado por todo o Brasil. Destes produtos, destacam-se os mais vendidos atualmente (Crystal[®], Dipel[®], e Xentari[®]), em que os produtos estão autorizados para o controle dos alvos biológicos indicados em qualquer cultura na qual ocorram. Levando em consideração tais fatores supracitados, o controle biológico vem sendo associado a outras formas no Manejo Integrado de Pragas (MIP), podendo estes ser utilizados separadamente ou associados (FIUZA, 2010).

2.3 ASSOCIAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* E EXTRATOS VEGETAIS SOBRE INSETOS-PRAGAS

Como já mencionado, tanto os extratos vegetais, quanto os produtos à base de Bt são importantes ferramentas para o controle de insetos-praga, podendo ser utilizados de forma associada ou simultaneamente, visando melhores resultados no controle de insetos-praga. Tal importância se dá devido aos distintos modos de ação de cada agente, que podem ser complementados. De acordo com Saito & Luchini (1998), a praga-agrícola quando em contato com metabólicos secundários oriundos de plantas pode desenvolver um quadro de estresse, doenças infecciosas tornando a praga mais susceptível a ação dos efeitos tóxicos produzidos pela bactéria, por exemplo.

Quanto ao controle de pragas, a associação dos métodos de controle citado anteriormente, podem apresentar diversas vantagens, tais como menores poluições ambientais por produtos químicos sintéticos, baixo risco de contaminação ao aplicar o produto pelo produtor entre outras vantagens. Nesse sentido, o uso de Bt e extratos vegetais pode ser uma alternativa inovadora e viável, surgindo uma nova estratégia para o controle de insetos-pragas.

Entretanto, considerando-se as características dos compostos presentes nos extratos vegetais, como já citado, estes podem agir negativamente ou positivamente sobre os micro-organismos, validando a importância de se estudar tal associação. Diversos trabalhos já estão sendo desenvolvidos em decorrência do uso de Bt em associação com extratos vegetais, visto que ambas as estratégias de controle são eficientes.

Resultados positivos de agentes fitossanitários em associação com micro-organismos são relatados por Singh et al., (2007), que utilizaram azadirachtina em combinação com Bt, sobre lagartas de *Helicoverpa armígera* (Hubner, 1808)

(Lepidoptera: Noctuidae) do primeiro ao quarto instar. Tais combinações, segundo os autores, resultaram em até 100% de mortalidade das lagartas, sendo o efeito da azadirachtina complementar, com a ação de Bt. Os efeitos positivos dessa associação também foram observados em trabalho utilizando-se harmaline, ricinina e seus efeitos combinados com Bt sobre *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), com resultados chegando a 87, 82% de mortalidade sobre a lagarta em comparação ao tratamento individual (82, 11%) (RIZWAN-UL-HAG et al. (2009).

Em estudo sobre o efeito de quatro extratos vegetais aquosos, entre estes *Ricinus communis* (L.), na concentração de 10% sobre Bt e sobre lagartas *A. gemmatalis* (em condições de laboratório, verificou-se que a mortalidade acumulada de *A. gemmatalis* (100%) causado pelo extrato de mamona associado com Bt foi maior do que utilizado isoladamente (16%), evidenciando que o mesmo não afetou a atividade tóxica de Bt (PESSOA et al., 2014).

Em outro trabalho semelhante foi avaliado o efeito de quatro vegetais *Ruta graveolens* (L.) (Sapindales: Rutaceae), *Eugenia uniflora* (L.) (Myrtales: Myrtaceae), *Mentha spicata* (L.) (Lamiales: Lamiaceae), e *Citrus sinensis* (L.) (Rutaceae), na concentração de 20%, em associação com três linhagens de Bt (ips82, br147 e br81), sobre cascudinho de aviário, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera.: Tenebrionidae), em condições de laboratório. A associação dos métodos causou mortalidade superior para larvas e adultos de cascudinho, comparados com a testemunha (ALENCAR, 2015). Tal acontecimento também pode ser confirmado por Pegorini (2016), que realizou a avaliação do efeito da associação de óleo essencial de *Eugenia uniflora* (Pitanga), em diferentes concentrações (0%; 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1%; 1,25% e 1,5%), e Bt, sobre *A. diaperinus*. De acordo com a autora, a associação de Bt e o óleo essencial de pitanga foram positivas, visto que na associação das diferentes linhagens de Bt (BR 137, BR 140 e BR 146), com o óleo essencial de *E. uniflora* a 1%, causou mortalidade acumulada, respectivamente 80,55%, a 81,94%, diferindo significativamente da testemunha (15,27%).

Já trabalho realizado por Lozano et al. (2017) teve por objetivo avaliar os efeitos de produtos fitossanitários naturais sobre esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki S-1905 (Btk S-1905). Para o bioensaio com esporos, os produtos naturais e bactérias foram aplicados em associação e separadamente, inoculadas em ágar nutriente (AN) e para o bioensaio com cristal, as misturas de Btk S-1905 + produtos naturais foram adicionados à dieta de *A. gemmatalis*. De acordo com os autores, os produtos naturais

Biogermex e Ecolife[®] quando associados a Btk S-1905, reduziram as Unidades formadoras de Colônia (UFC mL), enquanto que quando aplicados separadamente, apenas Ecolife[®] afetou negativamente as UFC. Com relação aos cristais foram observados efeitos aditivos e antagônicos da associação, sem, no entanto, afetar a morfologia do cristal ou causar degradação das proteínas deste.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico (LABCON) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV).

Os produtos à base de *B. thuringiensis* que foram utilizados são Crystal[®] (*Bacillus thuringiensis* subsp. *Tolworthi* isolado 344), Dipel[®] (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem HD-1) e Xentari[®] (*Bacillus thuringiensis*, subsp. *Aizawai*), adquiridos em lojas de insumos agrícolas. O extrato hexânico de *Ricinus communis* (EHRC) à 2% foi obtido da solução estoque do LABCON, através do preparo realizado conforme as dissertações de Gobo M; Bordin, T., 2021. O efeito do EHRC foi avaliado sobre os esporos de *B. thuringiensis* simulando-se a aplicação conjunta.

4.1 APLICAÇÃO CONJUNTA: PRODUTOS A BASE DE *B. thuringiensis* ASSOCIADOS AO EXTRATO HEXÂNICO DE *Ricinus communis*

4.1.1 Efeito do extrato hexânico de *R. communis* sobre esporos de *B. thuringiensis*

A partir dos produtos comerciais à base de Bt, foram preparadas suspensões e realizadas diluições seriadas em água Milli-Q[®] até $\times 10^{-6}$ (Fotografia 1A). Alíquotas de 60 μ L dessa suspensão foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 10 mL da solução a base de álcool 90% de extrato hexânico a 2% (Fotografia 1B). Para cada produto a base de Bt avaliado (tratamento), conforme a tabela 1, foram preparados quatro frascos de Erlenmeyer, sendo cada um considerado uma repetição. Os frascos foram incubados em um agitador horizontal (shaker) à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, por 2 h (Fotografia 2A). Previamente à incubação e ao término desta, com o auxílio de um pHmetro de bancada foi mensurado o pH de todos os tratamentos (Fotografia 2B). A partir de cada frasco tanto testemunha como os tratamentos, a mistura foi inoculada em

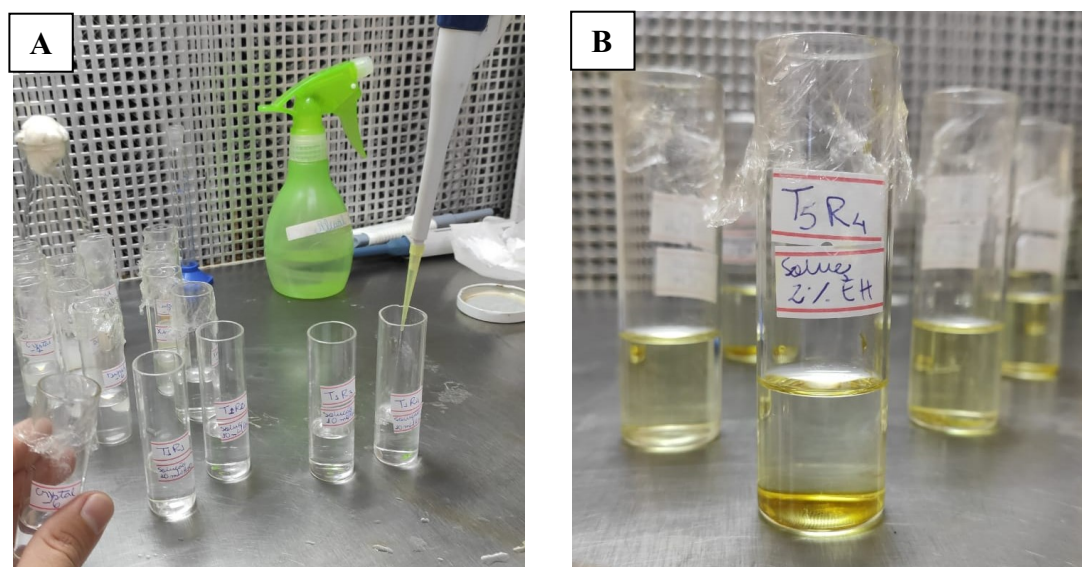
três placas-de-Petri, em sete pontos de 5 µL/ponto na superfície do meio de cultura ágar nutriente (AN) (Fotografia 3A). As placas permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos para ocorrer a evaporação do excesso de água (Fotografia 3B) e, em seguida conforme a Fotografia 3C, as mesmas foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada (BOD) à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 18 h, sendo posteriormente quantificadas as UFC/mL por ponto. Já para o cálculo do percentual de redução de Unidades Formadora de Colônia (UFC/ mL), utilizou-se a equação: $((\text{Média do Tratamento} / \text{Média da Testemunha}) * 100) - 100$, conforme Lozano et al. (2017).

Tabela 1: Tratamentos utilizados na aplicação conjunta dos produtos à base de *B. thuringiensis*, associados ao extrato hexânico de *Ricinus communis* 2%.

| Tratamentos | Agentes | Concentração |
|-------------|----------------------------------|---------------------------|
| 1 | Bt 1 Crystal [®] | 1×10^{-6} UFC/mL |
| 2 | Bt 2 Dipel [®] | 1×10^{-6} UFC/mL |
| 3 | Bt 3 Xentari [®] | 1×10^{-6} UFC/mL |
| 4 | Bt 1 Crystal [®] + EHRC | $1 \times 10^{-6} + 2\%$ |
| 5 | Bt 2 Dipel [®] + EHRC | $1 \times 10^{-6} + 2\%$ |
| 6 | Bt 3 Xentari [®] + EHRC | $1 \times 10^{-6} + 2\%$ |

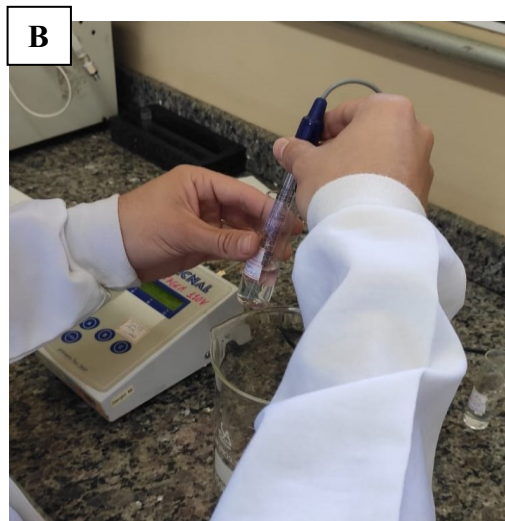
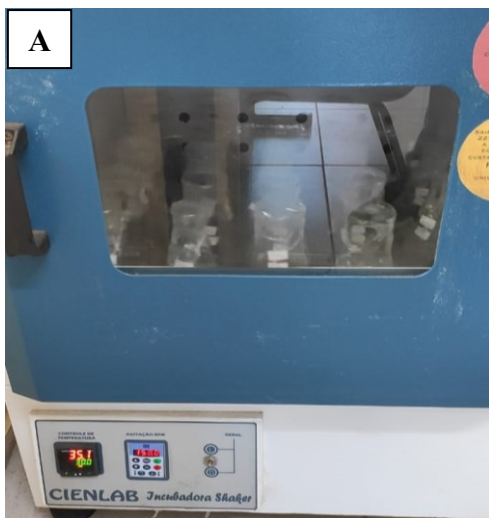
Fonte: Autoria própria (2021)

Fotografia 01: A) Diluições seriadas dos produtos à base de Bt. B) Solução contendo Bt + EH a 2%.



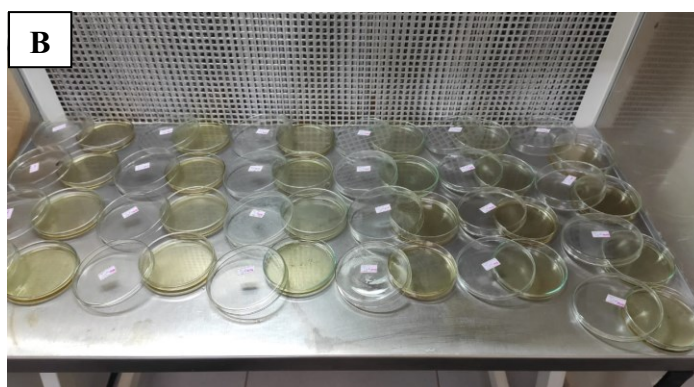
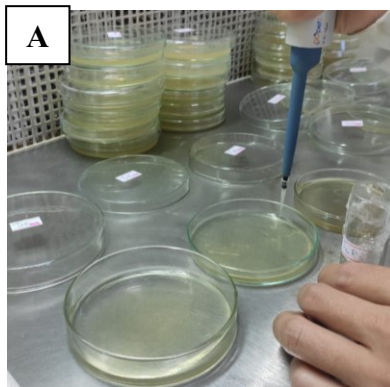
Fonte: Autoria própria (2021)

Fotografia 02: A) Tratamentos submetidos em um agitador horizontal (shaker) à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, por 2 h. B) Mensuração do pH antes e após dos tratamentos serem submetidos a agitação.



Fonte: Autoria própria (2021)

Fotografia 03: A) Inoculação dos tratamentos em placas de Petri em sete pontos de $5 \mu\text{L}/\text{ponto}$. B) Evaporação do excesso de água em câmara de fluxo laminar. C) Tratamentos acondicionadas em câmara climatizada (BOD) à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 18 h.



Fonte: Autoria própria (2021)

4.2 ANÁLISE MATEMÁTICA E ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos aos pressupostos de normalidade (Teste de Lilliefors) e como a distribuição foi normal, foram submetidos ao teste t de amostras pareadas ao nível de 5% de significância, com auxílio do programa estatístico Bioestat[®] 5.3 (AYRES, et al., 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que o EHRC à 2% reduziu as UFC/mL de *Bt* em todos os tratamentos, comparando-se às respectivas testemunhas, variando de 27,18% a 93,18% (Tabela 02). Tal redução também foi evidenciada visualmente (Fotografias 4, 5 e 6).

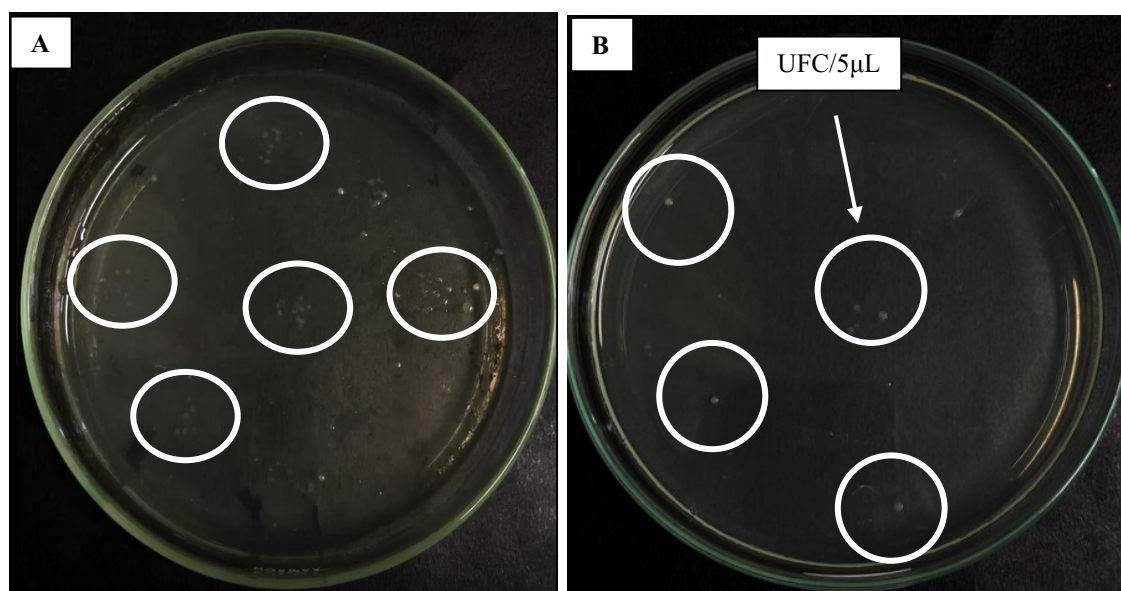
Tabela 02: Média de UFC/mL (\pm EP) a partir de esporos de *B. thuringiensis* com 2 horas de incubação ($30\pm 2^\circ\text{C}$ e 150rpm) com água Milli-Q[®] e EH a 2%.

| Tratamento | UFC/mL ($\times 10^{-6}$) | % de redução UFC/mL | pH | |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|------|------|
| | | | 0 h | 2 h |
| Testemunha | 8,20 \pm 0,33 a | -93,18 | 7,11 | 7,32 |
| Crystal [®] + 2% EH | 0,56 \pm 0,26 b | | 7,80 | 7,80 |
| p-valor | <0,0001 | | | |
| Testemunha | 10,08 \pm 0,43 a | -67,06 | 7,09 | 7,05 |
| Dipel [®] + 2% EH | 3,32 \pm 2,50 b | | 7,63 | 7,63 |
| p-valor | <0,0168 | | | |
| Testemunha | 13,21 \pm 1,53 a | -27,18 | 6,94 | 7,06 |
| Xentari [®] + 2% EH | 9,62 \pm 0,97 b | | 7,69 | 7,56 |
| p-valor | <0,0166 | | | |

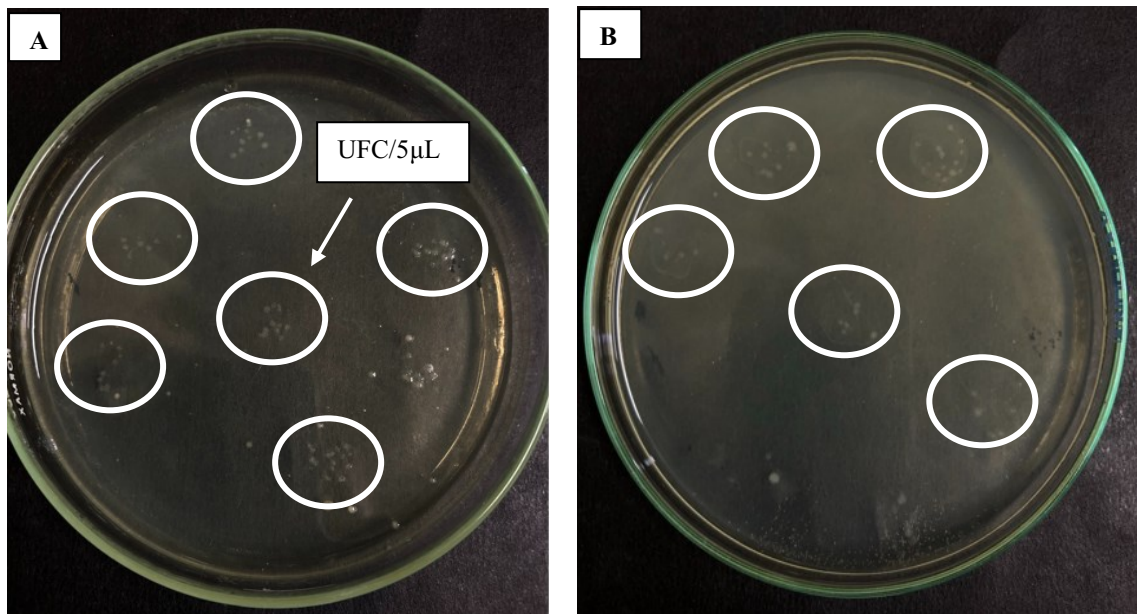
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Lilliefors ($p < 0,05$). Relação com a testemunha = [(Média de UFC/mL do tratamento/ Média de UFC/mL da testemunha \times 100) - 100], sendo os valores negativos para redução de UFC/mL.

Fonte: Autoria própria (2021)

Fotografias 04: UFC/5 μ L de *B. thuringiensis* a partir do produto Crystal[®] incubados em meio de cultura ágar nutriente ($30^\circ\text{C}\pm 2$, 18h), após agitação em shaker ($30^\circ\text{C}\pm 2$ e 150 rpm, 2h): A) Testemunha (Crystal[®] $\times 10^{-6}$ + água Milli-Q[®]) e B) Tratamento (Crystal[®] $\times 10^{-6}$ + EHRC 2%). Fonte: Autoria própria (2021)

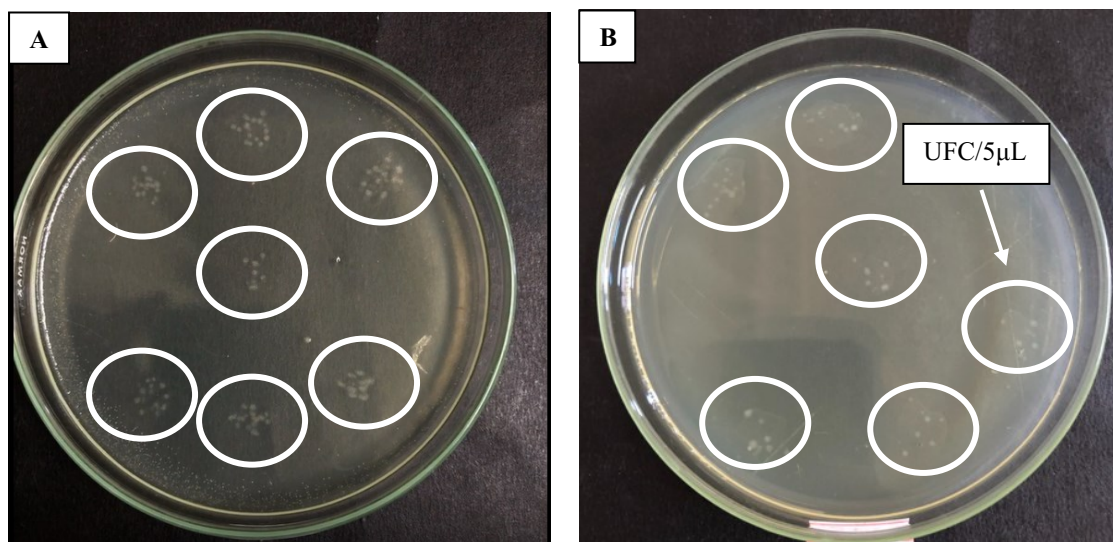


Fotografia 05: UFC/5 μ L de *B. thuringiensis* a partir do produto Dipel[®] incubados em meio de cultura ágar nutriente (30°C \pm 2, 18h), após agitação em shaker (30°C \pm 2 e 150 rpm, 2h): A) Dipel[®] x10⁻⁶ + água Milli-Q[®] e B) Tratamento (Diepl[®] x10⁻⁶ + EHRC 2%).



Fonte: Autoria própria (2021)

Fotografia 06: UFC/5 μ L de *B. thuringiensis* a partir do produto Xentari[®] incubado em meio de cultura ágar nutriente (30°C \pm 2, 18h), após agitação em shaker (30°C \pm 2 e 150 rpm, 2h): A) Xentari[®] x10⁻⁶ + água Milli-Q[®] e B) Tratamento (Xentari[®] x10⁻⁶ + EHRC 2%).



Fonte: Autoria própria (2021)

Em estudo semelhante, Silva et al. (2012) também associando diferentes produtos comerciais fitossanitários naturais, incluindo produtos à base de nim e calda bordalesa, com *B. thuringiensis subesp. Kurstaki* em ensaio *in vitro*, em três concentrações (1/2 Concentração Recomendada (CR), CR e 2x CR), verificaram que os produtos Agro-Mos[®]; Biogermex; Bovemax; Bordeaux mixture; Ecolife[®]; Dalneem; Pironim e Stubble Aid[®], reduziram significativamente a formação de UFC/mL variando de 18% a 100% no tempo de 18 horas após a inoculação e incubação da mesma.

Já em pesquisa realizada por Villani, et al. (2016), avaliando a atividade de extratos vegetais aquosos sobre Bt e a interação destes sobre *Anticarsia gemmatilis*, verificou-se que os extratos de pitanga (*Eugenia uniflora*), pimenta (*Capsicum baccatum*) e uva-do-japão (*Hovenia dulcis*) na concentração de 5% sobre os esporos, inibiu totalmente (-100%) a formação de UFC/mL da bactéria, interferindo negativamente na formação de UFC.

Entre as possibilidades da ausência de formação de UFC observada entre testemunha e tratamento nesta pesquisa, pode estar relacionada aos compostos oriundos do metabolismo secundário presente no extrato de *R. communis*. De acordo com Silva et al. (2012) os compostos químicos (naturais ou sintéticos) podem apresentar efeitos deletérios sobre os esporos, impedindo a germinação do mesmo ou destruindo a membrana celular da bactéria após a germinação.

Em estudo do derivado do produto comercial a base de óleo de *R. communis* (Poliqilgerm[®]), foi avaliado diferentes concentrações (1,0 e 0,2%) sobre a viscosidade produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* em diferentes meios de cultivo, condições de pH, e Temperatura, no tempo de 24 horas em contato com o produto. Foi observado que logo no tempo de 20 horas já era possível notar a inibição do crescimento bacteriano, sendo que para 1,0 % do produto houve de 97,1 a 100% de redução na UFC de *L. mesenteroides* e para 0,2% houve de 98,1 a 99,8% de diminuição respectivamente, nos pHs 6,0 e 5,0 (MESSETTI et al., 2010). O efeito antibacteriano do extrato etanólico de *R. communis* foi verificado também por Martínez Mora et al. (2018) sobre bactérias Gram negativas e positivas. A caracterização química detectou a presença de terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides e saponinas. O extrato etanólico apresentou notável atividade antibacteriano contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* e para bactéria Gram negativa *Proteus sp.*, evidenciando o uso potencial na ação antibacteriana.

Já há relatos de pesquisas científicas referentes a utilização de *Ricinnus communis* para o controle de doenças, nematoides e insetos, em virtude de compostos

tóxicos presente em suas folhas, frutos e sementes, sendo eles a ricina e a ricinoleína (WARMLING, 2018; DANTAS et al., 2019). No caso de *R. communis* se destaca por apresentar o alcaloide ricinina, presente tanto em folhas, sementes e frutos sendo de baixa toxicidade, solúvel em água, álcool éter, clorofórmio e apresentando efeito inseticida e bactericida. A ricina é uma proteína tóxica por ser inativadora de ribossomos, impedindo a síntese de novas proteínas e ocasionando a morte celular (CAZAL et al., 2009). Já os possíveis flavonoides presentes na planta são capazes de inativar proteínas extracelulares e causarem o rompimento da membrana da célula bacteriana (TSUCHIYA et al., 1996). No caso dos taninos estão relacionados à sua capacidade de se ligar a proteínas e enzimas, inativando-os, bem como inibindo fosforilação oxidativo de íons metálicos essenciais para alguns micro-organismos (SCALBERT, 1991). Nesse caso, além da ação dos alcaloides e flavonoides descritos anteriormente para as bactérias, os taninos podem ter atuado nas células de Bt após a germinação, evitando a fosforilação oxidativa, assim explicando a possível redução dos esporos de Bt quando associado com EHRC.

Em relação aos efeitos sobre os esporos, de forma geral, as UFC/mL obtidas nos tratamentos apresentaram crescimento reduzido, quando comparado com as suas respectivas testemunhas. Isto evidencia que o EHRC interferiu negativamente no metabolismo celular da bactéria ao entrar em contato com os esporos.

Ainda são poucos trabalhos a respeito de teste de *R. communis* sobre bactérias, em especial Bt. Considerando-se do ponto de vista ambiental, a avaliação da compatibilidade de produtos alternativos, seja eles, óleos, extratos vegetais juntamente com esporos de Bt é de fundamental importância para o sucesso da estratégia a campo que se enquadrem dentro das premissas básicas do Manejo Integrado de Pragas. A tendência é justamente caminhar em direção a alternativas que possam atender as demandas de um manejo mais sustentável.

Ainda cabe ressaltar que os esporos presentes em produtos a base de Bt também apresentam determinada toxicidade ao entrar em contato com o inseto, porém a atividade das proteínas do esporo acaba sendo inferior, pois tais proteínas são encontradas em uma quantidade menor quando comparada às do cristal. Segundo Habib & Andrade (1998), destaca que, para o completo ciclo no hospedeiro é necessário que os esporos germinem, dando origem a células que se multiplicarão e posteriormente originarão novos esporos e novas toxinas. Porém, vale enfatizar que a germinação dos esporos só ocorre com a mistura da hemolinfa ao conteúdo intestinal, quando se dá a redução do pH do meio em que os esporos se encontram e a oferta de nutrientes é maior. Ainda, segundo os autores,

a patogenicidade está diretamente relacionada a determinadas características do hospedeiro, como por exemplo: o pH intestinal, receptores moleculares, complexo enzimático e também características da própria bactéria, verificando-se diferenças na suscetibilidade dos insetos em relação ao patógeno.

Entretanto, para que se comprove de fato a possibilidade da não utilização de tal estratégia de integração, são necessários mais estudos referentes aos efeitos dos produtos fitossanitários sobre os cristais de Bt, uma vez que estes possuem papel importante para a eficiência de Bt no controle de insetos-praga.

6 CONCLUSÃO

O extrato hexânico de *Ricinus communis* a 2% reduziu as UFC/mL de *Bacillus thuringiensis* dos produtos comerciais Crystal[®], Dipel[®] e Xentari[®], sendo, portanto, incompatível aos esporos de Bt.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ, **Pesquisa de Agrotóxicos**. Disponível em:

<<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=387>> Acesso em: 14 set. 2021.

AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários), 2021. **Consulta de Ingrediente Ativo**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 14 set. 2021.

AGROLINK. **Brasil deve aumentar 40% em sua produção agropecuária até 2021**. Disponível em: < https://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-deve-aumentar-40--em-sua-producao-agropecuaria-ate-2021_348624.html>. Acesso em: 14 set. 2021.

ALENCAR, R. V. **Associação de pós vegetais e *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. ***Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, out/dez. 2010.

ARRUDA, F. P.; BATISTA, J. L. 1998. **Efeito da luz, de óleos vegetais e de cultivares de caupi na infestação do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae)**. Revista Caatinga, 11.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. **The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark**. Industrial Crops and Products, no prelo, v. 34, 2011.

AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. **Bioestat 5.3 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. **Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms**. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012. 116 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CAPALBO, D. M. F. et al. ***Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento: Folha de Viçosa*, Viçosa, n. 34, p. 309-350, jan./jun. 2005.

CAZAL, C. M. et al. **High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis***. *Journal Of Chromatography A*, [s.l.], v. 1216, n. 19, p.4290-4294, maio 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.008>.

CIRILO, V. K.; **Manual de Plantas Mediciniais**; Ed. Assessor, Francisco Beltrão, Paraná 1993, p. 12.

CRUZ, G.: **EFEITOS SUBLETAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS COM *Bacillus thuringiensis* VAR. aizawai SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

DANTAS, P. C. et al. **Toxicidade de extratos vegetais em *Coccidophilus citricola* (Brèthes, 1905) (Coleoptera: Coccinellidae)**. *Brazilian Journal of Development*, v. 5, n. 3, p. 2060–2067, 2019.

FIUZA, M. L.; BERLITZ, L. D. **Aplicações e interações no controle de insetos-pragas.** Pesquisa *Bacillus thuringiensis* e *Melia azedarach*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 35, 2010.

FILHO SAVY, A. 2005 [online]. **Cultura de mamoneira.** Disponível em: <<http://iac.sp.gov.br/Tecnologias/Mamona/Mamona.htm>.> Acesso em: 20 out. 2019.

FINNEY, D.J. **Probit analysis.** 3th ed. Cambridge University Press, London. 25P., 1971.

GALZER, W. E; FILHO, A. W. **Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas.** Rcevista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas. Laboratorio de Entomologia, Universidade de Caxias do Sul/carvi. Vol. 1, No 1 (2016).

GILL, S. S. **Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins.** Mem Inst. Oswaldo Cruz, v. 90, n.1, p. 69-74, jan./fev., 1995.

GOATER, B.; RONKAY, L.; FIBIGER, M. **Noctuidae Europeae.** Soro: Entomological Press, v.10, 452 p, 2003.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis* Biology, Ecology and safety.** Chichester: John Wiley & Sons, p. 350, 2000.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. **Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium.** Journal of Economic Entomology, Lanhan, v.69, n.4, p.487-497, 1976.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*).** EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, Documentos 10, 21p. 1985.

ISMAN, M. B. **Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world.** Annual Review of Entomology. Columbia, 2006.

ISMAN, M. B. **A renaissance for botanical insecticides?** Pest Management Science, v. 71, p. 1587–1590, 2015.

LOZANO, R. E. **Extratos vegetais e óleos essenciais sobre *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), agentes de controle biológico e o potencial como indutor de resistência em soja.** 2016. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos.

LOZANO, E. R. et al. **Action of natural phytosanitary products on *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S-1905.** Bulletin of Entomological Research, [s.l.], v. 108, n. 2, p.223-231, 26 jul. 2017. Cambridge University Press (CUP). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/s0007485317000670>>.

LOZANO, R. E. **Técnicas para avaliação in vitro do efeito de produtos fitossanitários em *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.** 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Marechal Cândido Rondon, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VIEGA JÚNIOR, V. F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 3. 2002.

MARANGONI, C; MOURA, N; GARCIA, F. **Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos.** Revista de ciências ambientais, Canoas, v.6, 2012.

MARSARO JUNIOR, A. L.; PEREIRA, P. et al. **Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no estado de Roraima.** Revista Acadêmica. Ciências Agrárias e Ambientais, São José dos Pinhais, v. 8, p. 71-76, 2010.

MARTÍNEZ MORA et al. **Caracterización fitoquímica y antibacteriana de *Ricinu Communis* L.** 2018. 21 f. Monografia. Universidade de Ciências Médicas de Cuba – Matanzas, 2018.

MARTINEZ, S. S. **Ação do nim sobre os insetos**. In: MARTINEZ, S.S. (Ed.). *O nim *Azadirachata indica*: natureza, usos múltiplos, produção*. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002.

MESSETTI, M, A. et al. **Estudo do derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, n.2, p.301-308, abr./jun., 2010.

MORRIS, O.N. **Effect of Some Chemical Insecticides on the Germination and Replication of *Commercialia Bacillus thuringiensis***. Journal of Invertebrate Pathology, v.26, n.2. p. 199-204, 1975.

MOSCARDI, F. **Uso de baculovírus e *Bacillus thuringiensis* no controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis***. In: CÔRREA-FERREIRA, B. S. *Soja orgânica: alternativas para o manejo dos insetos-pragas*. Londrina: Embrapa Soja, cap. 2, 2003.

MOSCARDI, et al. **Artrópodes que atacam as folhas da soja**. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. **Embrapa Soja**, cap. 4, 2012.

ONODY, H. C. **Estudo da fauna de Hymenoptera parasitóides associados a hortas orgânicas e da utilização de extratos vegetais no controle de *Plutellidae xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae)**. 2009. 127 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2009.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. **Lagartas na soja**. 2007. Disponível em: <http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=118909053>
2. Acesso em: 20 out. 2019.

PARRA, J. R. P et al. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole, São Paulo. 2002. 609p.

PEGORINI, C. S. **Associação do óleo essencial de *Eugenia uniflora* e *Bacillus thuringiensis* sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleop.: Tenebrionidae)**. 2016. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção e Nutrição Animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Dois Vizinhos-PR, 2016.

PENSADOR. **Ayrton Senna em entrevista ao jornalista João Dória Júnior, em 1994**. Disponível em: <<https://www.pensador.com/frase/MTE4ODIx/>> Acessado em: 28 set. 2021.

PEREIRA, D, S. **Plantas inseticidas: o que são, como agem, vantagens e desvantagens**. Disponível em: <http://novo.more.ufsc.br/dic_encyclop/inserir_dic_encyclop>. Viçosa: Agropós, 2018. Acesso em: 22 out. 2019.

PÉRES, V. F.; SAFFI, J.; INÊS, M.; MELECCHI, S.; ABAD, F. C.; JACQUES, R. A.; MARTINEZ, M.; OLIVEIRA, E.C.; CARAMÃO, E.B. **Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes: fatty acids and vitamin e from *Piper gaudichaudianum* kunth**. Journal of Chromatography A, 2006.

PESSOA, A. S.; LOZANO, E. R.; VILANI, A.; POTRICH, M.; MATOS, L. L.; OLIVEIRA, T. M.; PESSOA, G. M. *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebididae) sob ação de extratos vegetais. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, 2014.

POLHEMUS, N.W. **STATGRAPHICS Centurion**. Virginia, 1980.

POLANCZYK et al. **Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti***. Revista de Saude Publica, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2003.

QUEIROZ, S. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. **Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica**, Química Nova, v. 24, n. 1, 2001.

RIBEIRO. **Lagarta-falsa-medideira na cultura da soja**. Pesquisa publicada pelo site da PROMIP (Manejo Integrado de Pragas), julho de 2019. Disponível em: <<https://promip.agr.br/lagarta-falsa-medideira-cultura-soja/>>. Acessado em: 20 out. 2019.

RIZZO, M. R. 2005. **O biodiesel a partir da mamona é viável?** Disponível em: <www.artigos.com> Acesso em: 20 de out. 2019.

ROEL, A. R. 2001. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável**. Revista Internacional de Desenvolvimento Local, 1.

SAITO, M. L. & LUCHINI, F. 1998. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 46p.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. **Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional**. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2001.

SILVA, E. R. L.; ALVES, L. F. A.; MARTINELO, L.; FROMENTINI, M. A.; MARCHESE, L. P. C.; PINTO, F. G. S.; POTRICH, M.; NEVES, P. M. O. J. **Natural phytosanitary products effects on *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Berliner)**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, p. 2891-2904, 2012. Suplemento 1.

SINGH, J. **Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants in: extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. Triseste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3 ed., Londrina: Embrapa-Soja, 2014.

SUN, Y.; LIU, Z.; WANG, J. **Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *iris tectorum Maxim.*** Separation and Purification Technology, v. 78, p. 49–54, 2011.
SUN, Y.J.; MA, G.P.; YE, X.Q.; KAKUDA, Y.; MENG, R.F. **Ultrasonics Sonochemistry**, n. 17, p. 654-661, 2010.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, T.; TANAKA, T.; LINUMA, M. **Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Journal Ethnopharmacol, Ireland, v. 50, n.1, p. 27-34, 1996.

VIEGAS JÚNIOR. **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos.** Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Araraquara – SP. Quim. Nova, Vol. 26, No. 3, 390-400, 2003.

VILANI et al., 2016. **Activity of plant aqueous extracts on *Bacillus thuringiensis* and their interactions on *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Erebiniae).** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 38, n. 2, p. 1051-1058, mar./abr. 2017.

WARMLING, J. V. **EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DE EXTRATOS VEGETAIS ALCOÓLICOS SOBRE *Chrysodeixis includens* (WALKER, 1858) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).** 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Mestrado em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018.