

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
BACHARELADO EM AGRONOMIA

JOÃO PEDRO GUADAGNIN

***Bacillus thuringiensis* É PATOGÊNICO AO
PERCEVEJO-MARROM-DA-SOJA?**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS-PR

2022

JOÃO PEDRO GUADAGNIN

***Bacillus thuringiensis* É PATOGÊNICO AO PERCEVEJO-MARROM-DA-SOJA?**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,
apresentado como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano
da Silva.

DOIS VIZINHOS-PR

2022



[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.

JOÃO PEDRO GUADAGNIN

***Bacillus thuringiensis* É PATOGÊNICO AO PERCEVEJO-MARROM-DASOJA?**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,
apresentado como requisito para 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: 07 de Dezembro de 2022.

Everton Ricardi Lozano

Doutor

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Rodrigo Antunes Mendes Maciel

Doutorando

Universidade Federal do Paraná

Michele Potrich

Doutora

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DOIS VIZINHOS-PR

2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar expresso aqui, algumas palavras, breves, mas sinceras. Com toda certeza, ainda assim não seriam o suficiente para manifestar toda a minha gratidão, e não incluiria todas as pessoas que contribuíram na minha passagem pela Universidade, entretanto, todos estão em meu coração e serão lembrados pra sempre por mim!

Em primeiro lugar, sou grato pela minha vida, saúde e tudo que Deus me proporcionou até hoje em minha caminhada, me dando forças para superar os desafios encontrados durante esta jornada.

Agradeço acima de tudo, a minha família, em especial aos meus pais, Itamar e Rosana, e meu irmão, Alan, que me deram o suporte necessário ao longo de todos estes anos, e são meu alicerce dentro e fora da universidade, nos momentos bons e ruins, contribuindo para minha formação de caráter e ensinamentos de vida, tudo que sou veio destas pessoas.

Deixo aqui registrado também, a minha gratidão aos amigos, colegas de laboratório e professores que fizeram parte desta etapa da minha vida, sobretudo ao meu orientador, Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano, pelos ensinamentos, “puxões de orelha”, sabedoria e conselhos passados a mim, pela parceria em projetos de ensino, pesquisa e extensão, bem como nas confraternizações ao longo da graduação. Obrigado por ter me aceitado como seu orientado, e atuado como um “pai” dentro da universidade para mim, me ajudando a superar todas as dificuldades que surgiram neste capítulo da minha vida.

Sou também grato pela oportunidade de estar cursando e agora finalizando o curso de Agronomia na UTFPR- Campus Dois Vizinhos, que oferece educação pública, gratuita e de qualidade.

A parceria com as empresas Insuagro Insumos Agrícolas, Ballagro, Simbiose, Grupo Vittia e Gebana, que contribuíram fomentando a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que de alguma maneira participaram e me auxiliaram na minha minha passagem pela universidade, e na realização deste trabalho, deixo aqui o meu muito obrigado!

RESUMO

O controle biológico pode ser uma alternativa viável econômica e ecologicamente sustentável para a mitigação dos efeitos adversos ocasionados pela utilização única e exclusiva de inseticidas químicos sintéticos. A bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 é uma importante ferramenta no controle biológico de diversas pragas chave, das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, em especial. Entretanto, pouco se sabe acerca dos potenciais efeitos das toxinas Cry de Bt sobre insetos-praga da ordem Hemiptera, e em particular, sobre os pentatomídeos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (Bt) sobre *Euschistus heros*, em condições de laboratório. Para tal, foram avaliados cinco produtos comerciais: Dipel WP® (var. *kurstaki* HD-1), Xentari® (var. *aizawai* GC-91), Acera® (var. *aizawai* isolados 1641 e 1644), BT Control® (var. *kurstaki*, cepa HD-1 (CCT 1306)) e BT Turbo Max® (var. *kurstaki* HD-1), nas dosagens recomendadas em bula pelo fabricante. Os produtos comerciais foram fornecidos individualmente a ninfas de 3º instar e adultos de *E. heros*, previamente privados de alimentação por 16 horas, na dosagem de 5 µL para ambos os instares, em placas de acrílico, ingerindo diretamente do fundo da placa, sem qualquer substrato. Foram utilizados 25 insetos por tratamento, individualizados nas placas de acrílico, sendo cada inseto considerado como uma repetição. A ingestão foi confirmada visualmente e, após duas horas da aplicação, todos os insetos receberam um grão de soja cada, sem tratamento, que eram trocados a cada 2 dias para as ninfas e adultos sobreviventes de *E. heros*. As placas com os insetos foram acondicionadas em sala climatizada, à temperatura de 25± 2°C, umidade de 65 ± 10% e fotofase de 14h. A avaliação foi diária, durante sete dias, quantificando-se o número de mortos. Os produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* foram patogênicos, causando mortalidade entre 48% e 72% para ninfas de 3º instar de *E. heros*, e de 12% a 44% para adultos. Os inseticidas Dipel WP® e Xentari WG® se destacaram dentre os tratamentos, causando os maiores percentuais de mortalidade acumulada sobre insetos de 3º instar ao 7º dia de avaliação, com 72% e 64%, respectivamente. Já no bioensaio com adultos, os bioinseticidas BT Turbo Max® e Xentari WG® obtiveram os maiores percentuais de mortalidade acumulada, ambos com 44% ao 7º dia de avaliação. Os resultados obtidos neste estudo demonstram a maior suscetibilidade dos percevejos pentatomídeos a Bt nos seus instares iniciais de vida, em detrimento do seu contato com a bactéria enquanto já adultos, onde a mortalidade total acumulada no bioensaio com ninfas de 3º instar foi superior à observada no bioensaio com adultos de *E. heros*.

Palavras-chave: bactéria entomopatogênica; controle biológico; *Euschistus heros*;

ABSTRACT

Biological control can be a viable economic and ecologically sustainable alternative for mitigating the adverse effects provided by the unique and exclusive use of synthetic chemical insecticides. *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 is an important tool in the biological control of several key pests, of the orders Lepidoptera, Diptera and Coleoptera, in particular. However, little is known about the potential effects of Bt Cry toxins on insect pests of the Hemiptera order, and in particular, on pentatomids. In this context, the objective of this work was to evaluate the pathogenicity of commercial products based on *B. thuringiensis* (Bt) on *Euschistus heros*, under laboratory conditions. For this, five commercial products were evaluated: Dipel WP[®] (var. *kurstaki* HD-1), Xentari[®] (var. *aizawai* GC-91), Acera[®] (var. *aizawai* isolates 1641 and 1644), BT Control[®] (var. *kurstaki*, strain HD-1 (CCT 1306)) and BT Turbo Max[®] (var. *kurstaki* HD-1), in the dosages recommended in the package leaflet by the manufacturer. The commercial products were individually supplied to 3rd instar nymphs and adults of *E. heros*, previously deprived of food for 16 hours, at a dosage of 5 µl for both instars, in acrylic plates, ingesting directly from the bottom of the plate, without any substrate. 25 insects per treatment were used, individualized on acrylic plates, each insect being considered as a repetition. Ingestion was confirmed visually and, two hours after application, all insects received one soybean grain, without treatment, which were changed every 2 days for nymphs and adults of *E. heros* surviving. The plates with the insects were placed in a climate-controlled room, at a temperature of $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity of $65 \pm 10\%$ and photophase of 14 hours. The assessment was carried out daily, for seven days, quantifying the number of dead insects. Commercial products based on *B. thuringiensis* were pathogenic, causing mortality between 48% and 72% for 3rd instar *E. heros* nymphs, and between 12% and 44% for adults. The insecticides Dipel WP[®] and Xentari WG[®] stood out among the treatments, causing the highest percentages of accumulated mortality on 3rd instar insects on the 7th day of evaluation, with 72% and 64%, respectively. In the bioassay with adults, the BT Turbo Max[®] and Xentari WG[®] bioinsecticides had the highest percentages of accumulated mortality, both with 44% on the 7th day of evaluation. The results obtained in this study demonstrate the greater susceptibility of pentatomid bugs to Bt in their initial instars of life, to the detriment of their contact with the bacteria as adults, where the total mortality accumulated in the bioassay with 3rd instar nymphs was higher than that observed in the bioassay with adults of *E. heros*.

Keywords: entomopathogenic bacteria; biological control; *Euschistus heros*;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA NO BRASIL	8
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> (BERLINER, 1911): UMA FERRAMENTA DE SUCESSO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA	11
2.3 O PERCEVEJO-MARROM, <i>Euschistus heros</i> E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	15
2.4 POTENCIAL INSETICIDA DE <i>Bacillus thuringiensis</i> SOBRE A ORDEM HEMIPTERA	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 OBTENÇÃO DE <i>Euschistus heros</i>	21
3.2 OBTENÇÃO DOS PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> E TRATAMENTOS UTILIZADOS	21
3.3 EFEITO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> SOBRE <i>Euschistus heros</i>	22
4 DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae), é a principal *commodity* do Brasil, tanto é que o país é o maior produtor e exportador mundial da oleaginosa (CONAB, 2021). A cultura é acometida por uma série de insetos praga ao longo do seu ciclo fenológico, reduzindo a produção e a qualidade dos grãos. E dentre essas pragas, destacam-se os insetos da família Pentatomidae, sendo o percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* (Fabricius 1798), (Hemiptera: Pentatomidae), o principal deles (PANIZZI *et al.*, 2012; HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2012; BUENO *et al.*, 2021; MORAES *et al.*, 2022). Quando se alimenta durante as fases de desenvolvimento das vagens e enchimento de grãos, o percevejo-marrom-da-soja é responsável por reduções na qualidade e no peso das sementes de soja (CORRÊA-FERREIRA & AZEVEDO, 2002), ocasionando também distúrbios fisiológicos na planta (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000). As perdas acarretadas por *E. heros* podem chegar a até 30% na soja (VIVAN & DEGRANDE, 2011).

Normalmente são manejados através de táticas de controle químico, por meio de inseticidas químicos sintéticos, suprimindo-os e mantendo-os abaixo do nível de dano econômico (NDE), conforme sugere as práticas do manejo integrado de pragas (MIP) (BUENO *et al.*, 2013; PANIZZI, 2013). Entretanto, o uso único e exclusivo desta ferramenta de controle pode provocar perdas na biodiversidade, bem como propiciar a seleção de populações de pragas resistentes, surgimento de novos surtos de pragas, efeitos letais e subletais a organismos não-alvo, contaminação do solo, rios, atmosfera e acumulação de resíduos em alimentos (DEVINE & FURLONG, 2007; GUEDES & CUTLER, 2014). Isso demonstra a necessidade da busca por alternativas que sejam mais sustentáveis e economicamente viáveis para o controle da praga em questão, como o controle biológico.

Em agroecossistemas, quando populações de insetos ou fitopatógenos aumentam em níveis a ponto de causarem prejuízos econômicos e atingem o status de praga, seus inimigos naturais podem ser inseridos no sistema para suprimi-las, sejam eles entomopatógenos (fungos, vírus, nematoides e bactérias) ou entomófagos (predadores ou parasitoides). Estes atuam regulando as populações de suas presas ou hospedeiros, prestando o serviço ecossistêmico de controle biológico (FONTES & VALADARES, 2020).

O uso de microrganismos como agentes de controle biológico, de maneira geral, tem crescido exponencialmente e ocupado posição de destaque entre as opções que buscam o

controle de insetos-praga sem o uso excessivo de produtos químicos e com alta toxicidade (MASCARIN *et al.*, 2019; MEYER *et al.*, 2022). Neste contexto, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner 1909), se destaca por representar mais de 50% dos microrganismos utilizados no controle biológico de pragas agrícolas em diversas culturas, principalmente de insetos praga das ordens Lepidoptera e Coleoptera (LACEY, 2015).

No entanto, pouco ainda se sabe acerca dos efeitos e interações das toxinas Bt sobre os pentatomídeos, especialmente em *E. heros*. Existem poucos estudos na literatura sobre os mecanismos de suscetibilidade da ordem Hemiptera às toxinas Cry. Walters e English. (1995), estudaram a atividade tóxica de Bt contra o pulgão da batata, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Homoptera: Aphididae) e Porcar *et al.* (2008) relataram um isolado de Bt com atividade inseticida contra três espécies de hemípteros praga de coníferas. Porcar *et al.* (2009) descrevem toxicidade baixa a moderada de Bt ao pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), com mortalidade variando de 25% até 100%. Com relação aos pentatomídeos, Schunemann *et al.* (2018), em estudo com diferentes isolados de Bt, observaram até 98% de mortalidade sobre ninfas de 2º instar de *E. heros*, com a combinação de duas toxinas Cry purificadas (Cry2 e Cry9). Por sua vez, em trabalho conduzido por Da Costa *et al.* (2022), testando o efeito inseticida de diferentes toxinas Cry de Bt, destacaram quatro toxinas (Cry1B, Cry1G, Cry1Ia e Cry2Ab) causando de 90 a 100% de mortalidade ninfal em *E. heros*, após 7 dias de ingestão.

Neste contexto, considerando-se a importância agrícola que *E. heros* têm para a cultura da soja no Brasil, o potencial de controle de *B. thuringiensis*, bem como a demanda de ferramentas alternativas para o controle da referida praga, estudos com agentes de controle biológico se fazem necessários. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de produtos comerciais à base de Bt sobre ninfas e adultos *E. heros*, em condições de laboratório.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA NO BRASIL

Devido a expansão da fronteira agrícola brasileira impulsionada pela revolução verde, que se deu início por volta dos anos 1970, intensificou-se o uso de defensivos químicos sintéticos de maneira desenfreada e sem critérios. Com isso, inúmeros casos de seleção de populações de insetos-praga resistentes a inseticidas começaram a ser relatadas e se tornaram cada vez mais recorrentes, tornando certos produtos ineficientes. Conseqüentemente, fazendo-se necessário o desenvolvimento e rotacionamento com novos inseticidas químicos sintéticos para controlar as populações de pragas resistentes que foram selecionadas (BELCHIOR *et al.* 2014; LOPES & ALBUQUERQUE, 2018).

Neste contexto, com o passar dos anos, acentuou-se o debate e a preocupação quanto ao uso racional destes produtos sintéticos, devido aos malefícios ao meio ambiente, organismos não-alvo e aos seres humanos. Além disso, tem-se intensificado a discussão sobre a preservação e conservação dos recursos naturais, a segurança alimentar, a utilização de práticas mais conservacionistas e resilientes para o manejo de pragas, entre outros (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Neste cenário, o controle biológico se apresenta como uma alternativa para mitigar os impactos ambientais e minimizar a dependência única de inseticidas químicos sintéticos (SOSA-GÓMEZ., 2012).

O controle biológico é um fenômeno natural de regulação de uma população de um organismo pelo seu respectivo inimigo natural (GALLO, 2002). Este pode ser um predador ou parasitoide, denominados entomófagos, ou podem ser fungos, vírus, bactérias e nematoides, chamados de entomopatógenos. Estes compõem os denominados agentes de controle biológico, que atuam na manutenção da população de suas presas ou hospedeiros (GULLAN & CRANSTON, 2012; FONTES & VALADARES, 2020).

Além disso, o controle biológico é conhecido e classificado, didaticamente, em quatro vertentes: Controle biológico natural, conservativo, clássico e aplicado (van LENTEREN *et al.*, 2018). O controle biológico natural ocorre em todo e qualquer ecossistema, definido como a regulação da população de um inseto pelo seu respectivo inimigo natural, sem qualquer intervenção humana (GALLO, 2002; FONTES & VALADARES, 2020). A partir do entendimento deste fenômeno, é possível realizar o controle biológico conservativo, que consiste em ações humanas de manipulação do ambiente ou adoção de práticas para preservar

e conservar estes inimigos naturais, favorecendo a sua multiplicação e desenvolvimento, mantendo o equilíbrio do agroecossistema (BERTI-FILHO & MACEDO, 2010; VAN LENTEREN *et al.*, 2018; FONTES & VALADARES, 2020).

Já o controle biológico clássico, é baseado na importação e introdução de inimigos naturais visando o controle de pragas, por meio da busca dos agentes nos países e locais de origem da praga invasora, seguindo os procedimentos de quarentena, avaliando os riscos a biodiversidade e a organismos não-alvo com a introdução do inimigo natural, sendo uma medida de longo prazo (GALLO, 2002; BERTI-FILHO & MACEDO, 2010; FONTES & VALADARES, 2020). E como este foi o primeiro tipo de controle biológico deliberado e amplamente praticado, é chamado de controle biológico "clássico" (DEBACH, 1964).

O controle biológico aplicado por sua vez é fundamentado no aumento da população de um ou mais inimigos naturais (predadores, parasitoides e microorganismos), por meio de liberações inoculativas ou inundativas em uma determinada cultura, após sua multiplicação massal em laboratório, com meios de cultura artificiais e alternativas, ou sobre um hospedeiro, no caso de criações de predadores ou parasitoides (VAN LENTEREN *et al.*, 2018). Este tipo de controle tem por objetivo principal a redução rápida e eficiente da população da praga, suprimindo-a até ficar abaixo do seu nível de dano, ou seja, nível de não controle (GALLO, 2002; BERTI-FILHO & MACEDO, 2010; FONTES & VALADARES, 2020).

O primeiro programa de controle biológico aplicado com sucesso no Brasil, relatado por Salvadori e Salles. (2002), ocorreram nas décadas de 1970 e 1980, com a importação e introdução de forma inoculativa de predadores e de parasitoides para o manejo de pulgões na cultura do trigo, no estado do Rio Grande do Sul. Moscardi *et al.* (2011) também destacam o controle de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), atingindo cerca de 2 milhões de hectares de soja no Brasil, na safra 2003/2004, onde, na ocasião, fora empregado *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV) para o controle da praga em questão.

Outro caso de sucesso, aplicado continuamente, é o controle da broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae), pelo parasitoide de larvas *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae), e parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae), criados em laboratório com dietas artificiais e liberados massalmente na cultura da cana-de-açúcar

(PARRA, 2011). Cabe ressaltar também o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, empregado para o manejo da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* Stal (Hemiptera: Cercopidae) da cana-de-açúcar (PARRA, 2014), destacando-se tais agentes supracitados como um dos principais programas de controle biológico aplicado do Brasil e do mundo.

O controle biológico como um todo vem apresentando evolução e crescimento exponencial na sua adoção e aplicação, tanto na linha de macro, quanto microrganismos, entre 2015 a 2020, a taxa de crescimento do mercado global de controle biológico foi de 16%, enquanto que para os defensivos químicos foi próxima de 1%. O portfólio de produtos biológicos conta com 433 produtos registrados para uso no Brasil atualmente, e a expectativa é de que o mercado mundial de controle biológico continue crescendo, chegando a alcançar o valor de 11,1 bilhões de dólares em 2025 (Croplife, 2022). Entretanto, grandes *commodities*, como é o caso da soja, milho e algodão, a prevalência do controle químico sobre o biológico para o manejo de pragas ainda é predominante, porém este cenário tem mudado ano após ano (FARIA, 2017).

Com relação aos macrorganismos, na cultura do milho e na cultura do algodão, o parasitoide de ovos de lepidópteros *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é o principal agente empregado (PARRA & ZUCCHI, 2004; PARRA, 2014). Importante ressaltar também os ácaros predadores pertencentes à ordem Acari, que são exímios agentes de controle de tripes, ácaros fitófagos, mosca branca, ovos e larvas de moscas, em cultivos ornamentais, citros, hortaliças e em casas de vegetação (CARRILLO *et al.*, 2015; VAN LENTEREN *et al.*, 2020). Se tratando da cultura da soja, destaca-se o parasitoide de ovos de percevejos, *Telenomus podisi* Ashmead, 1893 (Hymenoptera: Platygasteridae), tendo como principal alvo o percevejo-marrom, *E. heros* (VAN LENTEREN *et al.*, 2020).

No que se refere a linha de microrganismos que são aplicados no controle biológico de pragas, deve-se dar enfoque aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* e *Cordyceps fumosorosea*. Estes são empregados, principalmente para o manejo de pragas chave, como mosca branca, ácaros, cigarrinhas e coleópteros, em diversas culturas anuais e perenes de interesse que, juntos somam mais de 8 milhões de hectares aplicados (LACEY *et al.*, 2015; VAN LENTEREN *et al.*, 2020). Já no âmbito de vírus entomopatogênicos, os representantes da principal família de vírus

Baculoviridae com efeito inseticida são, Nucleopolyhedrovirus (NPV) e Granulovirus (GV), sendo os mais estudados e de maior importância econômica no controle biológico de pragas, principalmente de lepidópteros (FEDERICI, 1997; MEYER *et al.*, 2022), aplicados em aproximadamente 2 milhões de hectares (HARRISON *et al.*, 2018; VAN LENTEREN *et al.*, 2020).

Dentre os microrganismos, o mais utilizado e de maior importância econômica nacional no controle biológico de pragas é a bactéria Gram positiva esporulante, *Bacillus thuringiensis*, que é tóxica para diferentes insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, bem como a nematoides (BRAVO *et al.*, 2005; VAN FRANKENHUYZEN, 2009). O sucesso de sua aplicação em larga escala são fruto do seu modo de ação e controle eficaz dos insetos alvo, bem como a seletividade e maior segurança para mamíferos e outros organismos não-alvos comparado com os inseticidas químicos sintéticos, atrelado a sua formulação semelhante aos produtos fitossanitários já existentes no mercado e de conhecimento dos agricultores, facilitando assim, o seu manuseio e aplicação (LACEY *et al.*, 2015). Bt representa cerca de 98% do mercado mundial de inseticidas microbianos, e no Brasil compreende uma área de mais de 5 milhões de hectares em que a bactéria é utilizada (POLANCZYK *et al.*, 2017).

Atualmente, 38 produtos comerciais à base de Bt estão registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e são comercializados no Brasil (Agrofit, 2022). Recomendados em suma para o controle de pragas das ordens Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* Meyrick, 1971 (Lepidoptera: Gelechiidae).

2.2 *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1911): UMA FERRAMENTA DE SUCESSO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA

Como já mencionado, *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, esporulante, da família Bacillaceae, sendo aeróbica ou facultativamente anaeróbia, virulenta, que produz toxinas durante o processo de esporulação. A referida bactéria tem capacidade de invasão e liberação de toxinas, quando ingeridas pelos seus hospedeiros (ANGELO; VILAS-BÔAS;

CASTRO-GÓMEZ, 2010). É naturalmente encontrada no solo, em cadeias ou formas individuais, sendo que suas células possuem formato de bastonete, com dimensões de 1,0 a 1,2 μm de comprimento e 3,0 a 3,5 μm de largura. Desenvolvem-se em condições de temperatura entre 10 a 45°C, com temperatura ideal de 30°C, podendo se manter em latência na forma de endósporos, sob condições adversas (BRAVO *et al.*, 2011).

A sua descoberta se deu no ano de 1901, por Ishiwata, no Japão, em criação do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. 1758, (Lepidoptera: Bombycidae). Em 1911 foi estudada por Berliner, na Thuringia, Alemanha, após ter sido isolada de lagartas de *Ephestia kuehniella* Zeller 1879 (Lepidoptera: Pyralidae). Após demonstrar efeito tóxico em lagartas de *B. mori*, e ser considerada um risco para a indústria da seda Japonesa, somente em 1927 Bt teve seu efeito como potencial agente de controle biológico investigado contra *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) (MATTES, 1927). Os resultados promissores alcançados em laboratório levaram ao início da produção comercial de Bt na França e a primeira formulação comercial foi registrada em 1938, com o lançamento do Sporine®, se tornando a partir da década de 1960 o microrganismo mais utilizado no mundo para o controle de pragas agrícolas, florestais e de insetos vetores de doenças humanas (CAPALBO *et al.*, 2004; FIUZA & BERLITZ, 2010).

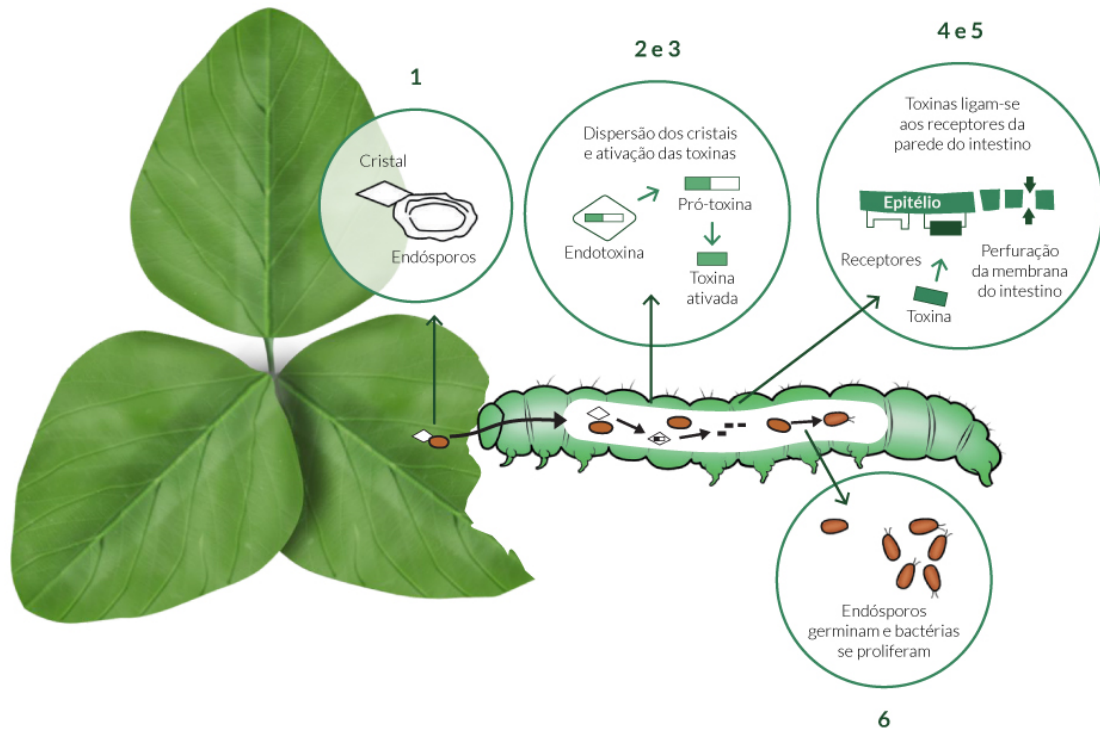
B. thuringiensis possui como característica típica a produção de cristais proteicos intracelulares, que não possui ação tóxica. Após a ingestão e dissolução em meio de pH alcalino, libera pró-toxinas, que ao serem atacadas pelas enzimas digestivas dos insetos são ativadas, resultando em moléculas de ação tóxica, as toxinas Cry, com toxicidade variada para insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera (SOUZA *et al.*, 1999; BERTI-FILHO & MACEDO, 2010). Os cristais proteicos são formados no momento da esporulação dentro do corpo de inclusão e possuem formato variado, de acordo com o isolado a qual pertencem, podendo ser: bipiramidais, piramidais, cubóides, rombóides, esféricos, retangulares, ou ainda sem forma definida, constituídos por uma ou mais toxinas Cry (FIUZA *et al.*, 2017).

Tal estrutura é a principal responsável pela sua atividade inseticida, bem como o principal fator de distinção entre *B. thuringiensis* e as demais bactérias formadoras de esporos (ANGUS, 1956; HANNAY, 1953; PARK *et al.*, 2014). Podem produzir as toxinas Cry, Cyt e Vip, sendo que as toxinas Cry são as mais famosas e estudadas devido ao seu potencial

inseticida. Com relação a classificação das toxinas Cry, é relativa à quantidade e qualidade das mesmas e estes parâmetros estão relacionados ao isolado e subespécie de *B. thuringiensis* (FIUZA *et al.*, 2017). Independente do tipo de proteínas tóxicas produzida pela linhagem, o seu modo de ação tende a ser semelhante, por conta do compartilhamento de uma estrutura particular na toxina Cry.

Seu modo de ação se dá após a ingestão dos cristais e dos esporos presentes na bactéria pelo inseto (Figura 2 (1)), seguido pela solubilização dos cristais em condições de pH alcalino e a liberação das delta-endotoxinas inativas. Com isso, inicia-se o processo de ativação das pró-toxinas por meio de proteases presentes no suco digestivo (Figura 2 (2 e 3)). Na sequência, as toxinas ligam-se a receptores específicos localizados na membrana do mesêntero, induzindo o processo de oligomerização, e posteriormente, a ligação a receptores mais específicos presentes nas microvilosidades das células epiteliais do mesêntero. Em consequência deste processo, ocorre a formação de poros na membrana celular, ocasionando alteração na permeabilidade das células. Essa alteração leva a uma lise celular que resulta na ruptura da integridade intestinal, podendo causar a morte por septicemia (Figura 2 (4 e 5)). Caso o inseto sobreviva, ocorre o contato das fezes com a hemolinfa e os esporos germinam e se multiplicam, causando uma infecção generalizada, que leva o inseto à morte (Figura 2 (6)) (GILL, 1995; CAPALBO *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2007).

Figura 2: Representação do modo de ação de *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Grupo Vittia.

Segundo dados da Embrapa (2019), já existem 4.500 isolados de *B. thuringiensis* no Banco Ativo de Germoplasma de Microrganismos (BAG Microrganismo), da Embrapa Milho e Sorgo. A nível mundial, há mais de 300 produtos comerciais à base Bt (CAB International Centre, 2010; GALZER & FILHO, 2016), destes 38 estão registrados no MAPA e são comercializados no Brasil (Agrofit, 2022). Atualmente existem aproximadamente 820 genes Cry (Cry 1-Cry 78) e 147 Vip (Vip 1, 2 e 3) que foram detectados e caracterizados de diferentes subespécies de Bt em todo o mundo (CRICKMORE *et al.*, 2021).

Além da utilização como inseticida biológico e como uma ferramenta importante no MIP, *B. thuringiensis* também é uma ferramenta primordial no controle varietal, tanto de pragas lepidópteros quanto de coleópteros (DE MAAGD *et al.*, 1999). Isto se dá pela transgenia de plantas, por meio da inserção de genes *Cry* e genes *Vip* de Bt. Estes genes possibilitam a expressão contínua das proteínas Cry e Vip, respectivamente, em todos os tecidos da planta, atingindo, assim, apenas os insetos-praga sujeitos aos efeitos tóxicos de Bt ao se alimentarem da planta (SMITH, 2005).

Porém, apesar de todos estes benefícios proporcionados por Bt, nas mais variadas esferas e escalas, sua ação e efetividade é mais pronunciada e conhecida sobre determinadas ordens de insetos-praga em detrimento de outras, como os Hemiptera. Neste sentido, muitos estudos e propostas de intervenção já foram desenvolvidos para a solução dos problemas decorrentes do tema “Bt”, em especial se tratando de pesquisas relacionadas a insetos-praga das ordens Lepidoptera e Coleoptera e sua dinâmica com Bt. Em contrapartida, no que se diz respeito a estudos e pesquisas direcionadas a problemática de pragas da ordem Hemiptera para com Bt, estes são escassos, demandando investigações.

2.3 O PERCEVEJO-MARROM, *Euschistus heros* E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

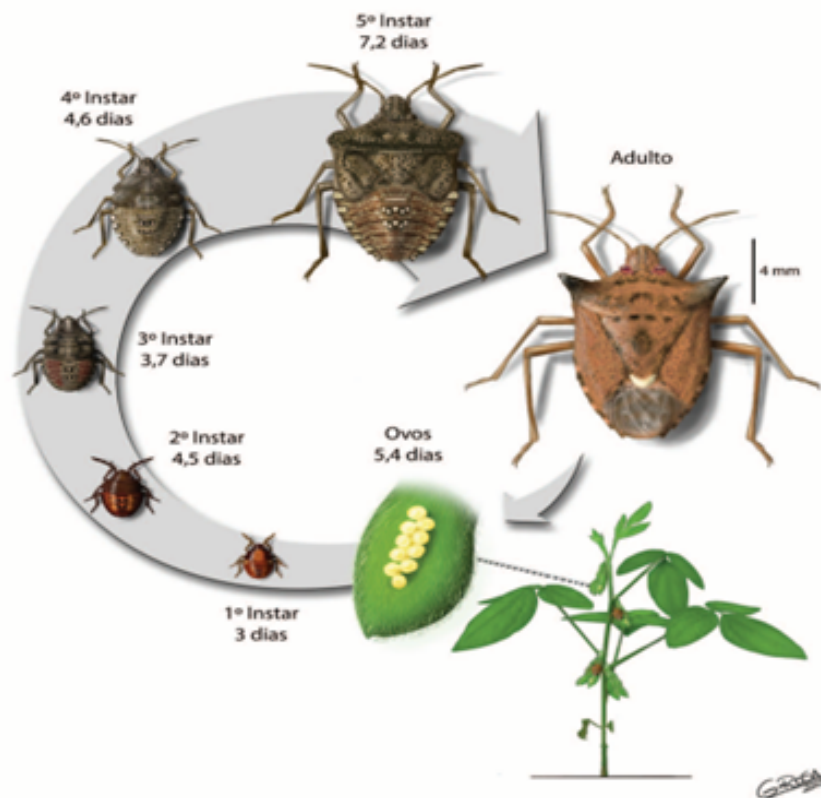
Euschistus heros, vulgarmente conhecido como percevejo-marrom-da-soja, é um inseto-praga da ordem Hemiptera e da família Pentatomidae, nativo da Região Neotropical e ocorrendo na América do Sul (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000; PANIZZI, 2004). O primeiro registro de sua ocorrência no Brasil foi feito por Williams *et al.* (1973), em cultivo de soja no Estado de São Paulo. É o percevejo mais abundante na cultura da soja, sendo bem adaptado às variações de latitude (CIVIDANES & PARRA, 1994; CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; PANIZZI *et al.*, 2012), com ocorrência nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, evidenciando sua capacidade de adaptação às diferentes condições edafoclimáticas encontradas no país (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2020; HICKMANN *et al.*, 2021).

Apresenta desenvolvimento hemimetábolo e, após eclodir do ovo passa por cinco estádios de desenvolvimento ninfal (instares), até atingir a vida adulta. As ninfas recém-eclodidas de 1º instar medem em torno de 1 mm e tem corpo alaranjado e a cabeça preta, com coloração que pode variar de cinza a marrom (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000). Possuem hábito gregário e permanecem sobre os ovos durante este estágio, além de ainda não se alimentarem, pois, seu aparelho digestivo encontra-se em formação (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999;). Iniciam sua alimentação no 2º instar, entretanto é a partir do 3º instar com 3,63 mm de tamanho, que as ninfas começam a causar danos diretos à cultura (PANIZZI *et al.*, 2012).

Os adultos de *E. heros* apresentam coloração marrom-escura e tem cerca de 11 mm de comprimento, com uma “meia lua” branca no final do escutelo e dois prolongamentos laterais,

no formato de espinhos, no protórax. Em torno de 10 dias após atingirem a maturidade, inicia-se a cópula e, após 13 dias as primeiras oviposições (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000; GALLO, 2002;). Seus ovos têm coloração amarelada, depositados pelas fêmeas normalmente nas folhas ou nas vagens, em fileiras duplas, com massas de 5 a 8 ovos que, quando próximos à eclosão, apresentam uma mancha rósea (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2014). De acordo com Costa *et al.* (1998), uma única fêmea de percevejo pode ser capaz de ovipositar de 120 a 310 ovos durante sua longevidade.

Figura 1: Ciclo de desenvolvimento do percevejo-marrom.



Fonte: Cividanes, 1992.

As fêmeas, em geral, são maiores que os machos e, enquanto adultos, podem apresentar longevidade de até 300 dias, vivendo em média 116 dias, e variando de acordo com as condições do ambiente (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000). Na cultura da soja a praga é encontrada entre os meses de novembro a abril em elevada atividade biótica, produzindo até três gerações consecutivas durante o ano, e podendo chegar até 6, dependendo da região (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999). Durante o período de entressafra (maio a

novembro), entram em diapausa, permanecendo abrigados em plantas hospedeiras ou restos da cultura antecessora, utilizando-se de suas reservas energéticas antes de se deslocarem para os nichos de hibernação e entrarem em dormência (VIVAN & DEGRANDE, 2011).

Os danos ocasionados pelo percevejo-marrom na cultura da soja podem atingir até 30% de perdas (VIVAN & DEGRANDE, 2011), ocorrendo principalmente entre os estádios R3-R5 (desenvolvimento de vagens ao enchimento de grãos), atacando as vagens e grãos (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999). O inseto se alimenta por meio da inserção do seu estilete nos tecidos vegetais, injetando toxinas juntamente com enzimas digestivas presentes na saliva, seguido da sucção do conteúdo liquefeito. E em decorrência desse processo, pode resultar em danos diretos como redução de peso dos grãos, má formação, grãos chochos e com manchas, conseqüentemente, diminuindo o rendimento final da cultura (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000; GALLO, 2002).

Além disso, podem provocar retenção foliar, também conhecida como “soja louca”, onde a planta sofre um distúrbio fisiológico que prolonga a sua senescência, permanecendo com hastes e folhas verdes por mais tempo, comprometendo a maturação e gerando desuniformidade para a colheita (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Cabe ainda destacar, que em ataques no início do período reprodutivo da soja, pode ocorrer o abortamento de vagens e grãos, e nos ataques em estágios mais avançados de formação dos grãos, ocorre a redução na qualidade fisiológica da semente, na viabilidade, no vigor, germinação, e alterações nos teores de proteína e de óleo (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000; GALLO, 2002).

Existem 116 produtos registrados para o controle do percevejo-marrom, dos quais 83 produtos são para a cultura da soja, conforme dados do MAPA (Agrofit, 2022). O controle desta praga é realizado basicamente por inseticidas químicos sintéticos dos grupos dos organofosforados, piretróides, neonicotinóides e etiprole (CORRÊA-FERREIRA & PANIZZI, 1999; PANIZZI, 2013). O nível de ação/controle para a tomada de decisão é de 1 inseto/m² em lavouras de soja para semente e de 2 insetos/m² em áreas para grãos, conforme as práticas e filosofias do MIP-soja (BUENO *et al.*, 2013; PITTA *et al.*, 2018).

Contudo, tem-se observado o uso de inseticidas químicos sintéticos de mesmo mecanismo de ação, mais de uma vez durante a mesma safra ou ano, atrelado a monocultura de soja, somado a falta de integração de métodos no manejo das demais pragas, com critérios

no monitoramento e na tomada de decisão para o controle. Tais fatores têm desencadeado o desenvolvimento de resistência de *E. heros* a algumas das principais moléculas inseticidas disponíveis no mercado (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2001; SOSA-GÓMEZ *et al.* 2009; SOSA-GÓMEZ & SILVA, 2010; SOSA-GÓMEZ., 2012; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2020).

Diante do exposto, é evidente a necessidade de novas pesquisas e o desenvolvimento de novas técnicas e ferramentas de manejo desta praga chave. Tais ferramentas são importantes visando integrar práticas e buscar soluções ecologicamente corretas e economicamente sustentáveis, a longo prazo.

2.4 POTENCIAL INSETICIDA DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE A ORDEM HEMIPTERA

Os insetos da ordem Hemiptera se apresentam com aparelhos bucais que perfuram os tecidos e sugam a seiva (GULLAN & CRANSTON, 2012). Como Bt age nas células do mesêntero e necessita ser ingerido, o hábito alimentar dos percevejos é um fator limitante para a ingestão dos cristais protéicos de Bt, constituintes dos bioinseticidas. No caso das plantas transgênicas a ingestão também não ocorre, pois os cristais se encontram nos tecidos e não livres na circulação da planta (floema) (CRISTOFOLETTI *et al.*, 2003). Além disso, a digestão do floema é extra-oral, por meio da secreção de saliva contendo proteases, que realizam a pré-digestão dos nutrientes contidos na seiva antes de seguirem para o intestino do inseto, diminuindo o tempo de contato dos cristais com o trato digestivo (CHOUGULE & BONNING, 2012).

Contudo, caso ocorra a ingestão dos cristais proteicos pelos percevejos, outro fator determinante, é o pH intestinal do inseto, uma vez que a solubilização da toxina não ocorre devido ao seu pH ácido (CRISTOFOLETTI *et al.*, 2003). Isto porque pode estar associado ao tipo de enzimas proteolíticas e a abundância relativa destas encontradas em seu intestino, pois, a ativação proteolítica da toxina Bt ingerida no intestino do inseto é essencial para a expressão de sua toxicidade (TORRES & RUBERSON, 2008; CHOUGULE & BONNING, 2012).

De maneira geral, alguns estudos foram feitos empregando toxinas de Bt como alternativa para o manejo de pragas da ordem Hemiptera. Em alguns trabalhos não se obteve resultados positivos, conforme relata Walters e English. (1995), ao não obterem atividade tóxica de Bt contra o pulgão da batata, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Homoptera: Aphididae), submetidos a ingestão de toxinas Cry2, Cry3 e Cry4 e nem para pulgão da

ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), quando expostos às toxinas Cry1Ac e Cry3Aa. Embora segundo Chougule & Bonning. (2012), a toxicidade das três toxinas Bt usadas no estudo de Walters e English. (1995) possa ter sido subestimada devido ao uso de toxinas Cry em ensaios de alimentação, ao em vez de toxinas pré-solubilizadas.

Porcar *et al.* (2008) relatam em seu estudo um isolado de Bt com atividade inseticida contra três espécies de hemípteros que são pragas de coníferas. E em outra pesquisa, Porcar *et al.* (2009) descrevem toxicidade baixa a moderada de Bt ao pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), com mortalidade variando de 25% até 100%, atribuindo esses resultados a metodologia adotada de pré-ativação das proteínas Cry com tripsina, protease tipicamente presente em lepidópteros. Em testes utilizando a cisteína-protease, para a mesma espécie de pulgão, também foi observada atividade proteolítica eficiente (Li *et al.*, 2011). Sattar & Maiti. (2011) encontraram alta toxicidade da proteína inseticida vegetativa (Vip), Vip1A e Vip2A purificadas de isolados de Bt contra o pulgão do algodão, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Em um estudo mais completo feito por Schunemann *et al.* (2014), onde traz registros de diversos autores no que se refere a diferentes toxinas de Bt, demonstra que existe uma certa suscetibilidade de alguns insetos da ordem a determinadas toxinas Bt.

Poucos são os relatos nesta área, e o que se encontra atualmente na literatura são basicamente investigações acerca dos potenciais efeitos das toxinas Cry de plantas Bt em artrópodes não-alvo, como predadores e parasitoides (GONZÁLEZ-ZAMORA *et al.*, 2007; LOVEI *et al.*, 2009). Conforme relata Bell *et al.* (2005), que analisaram a ação de proteases no trato digestivo do predador *Podisus maculiventris* Say (Heteroptera: Pentatomidae), após a ingestão de presas que se alimentavam de plantas transgênicas. Trabalho semelhante fora feito por Cunha *et al.* (2012) com o predador *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Hemiptera: Pentatomidae), demonstrando interferência na sua capacidade de predação ao se alimentar de larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) criadas em algodão Bt.

Dorta *et al.* (2010) testando toxinas Cry contra ninfas de 2º instar de psílideo dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em *Citrus sinensis* (L.), destacaram 3 isolados causando 42%–77% e 66%–90% de mortalidade ninfal em 2 e 5 dias após a inoculação, respectivamente. Salazar-Magallon *et al.* (2015) encontraram resultados positivos

de com alguns isolados de Bt sobre ninfas de 3º e 4º instar de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera Aleyrodidae) na cultura do tomate, com mortalidade superior a 90%. Em trabalho também na cultura do tomate e com *B. tabaci*, Torres Cabra *et al.* (2019) observaram a mortalidade variando de 18% a 69% em ninfas de 2º instar da praga em questão. Da Costa *et al.* (2021), em estudo com *B. tabaci* na cultura do algodão, constataram interferência na capacidade de oviposição da praga em plantas de algodão tratadas com Bt, em comparação a plantas não tratadas.

Em estudo realizado por Schunemann *et al.* (2018), foram obtidos resultados promissores em relação ao potencial inseticida de isolados de Bt sobre *E. heros*. Segundo os autores, a combinação de duas toxinas Cry (Cry2 e Cry9) purificadas causaram 98% de mortalidade sobre ninfas de 2º instar, em condições de laboratório. Ainda, em trabalho parecido conduzido por Da Costa *et al.* (2022), avaliando o efeito e potencial inseticida de diferentes toxinas Cry purificadas fornecidas em dieta líquida artificial para *E. heros*, destacaram-se as toxinas Cry1B, Cry1G, Cry1Ia e Cry2Ab, causando 90-100% de mortalidade ninfal em *E. heros* após 7 dias de ingestão.

Desta forma, dada a lacuna de informações existentes nesta temática e a importância econômica dos pentatomídeos, fica evidente a necessidade de estudos e pesquisas nesta área, buscando compreender melhor os efeitos potenciais de Bt sobre *E. heros*, para o desenvolvimento de novas ferramentas e aprimoramento das estratégias aplicadas para o manejo desta praga-chave. Pois, conforme enfatiza Polanczyk *et al.* (2022), a pesquisa de bioinseticidas a base de Bt que tenham efeito para sugadores vêm ganhando atenção nos últimos anos, devido aos grandes impactos que esses insetos vêm causando em diversas culturas, em especial na cultura da soja.

Neste sentido, o presente trabalho se mostra inovador, por avaliar a patogenicidade de bioinseticidas comerciais à base de Bt já registrados e comercializados, em *E. heros* em estágio ninfal e adulto sob condições de laboratório. Diferentemente dos trabalhos encontrados em sua maioria na literatura, que focam e dão preferência em avaliar os efeitos das proteínas isoladas sobre Hemiptera. Caracterizando este trabalho, como um estudo de grande importância, que poderá contribuir como base para outras pesquisas semelhantes, e também para o desenvolvimento de novas estratégias e ferramentas para o manejo desta praga-chave.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 OBTENÇÃO DE *Euschistus heros*

Os insetos necessários para realização do experimento foram adquiridos ainda na fase de ovos, em parceria com a empresa especializada na criação de insetos, Corteva Agriscience®, de Toledo-PR. Inicialmente foram acondicionados em recipientes gerbox (3 x 11 x 11 cm), com capacidade de 250 mL, forrados com papel filtro ao fundo, acomodados na sala de criação, em condições de temperatura de 25 ± 2 °C, fotofase de 14 horas e umidade relativa (UR%) $65 \pm 10\%$. Conforme os insetos eclodiram (5-7 dias), e de acordo com seus instares de desenvolvimento, foram transferidos para recipientes maiores a fim de obter uma melhor relação entre número e tamanho de indivíduos por área disponível.

A partir da eclosão, foram disponibilizadas vagens frescas de feijão-verde orgânico, *Phaseolus vulgaris* (L.) (Fabales: Fabaceae), devidamente esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,01%), e trocadas de acordo com a necessidade. Ao atingirem o 3º instar foram transferidos a recipientes plásticos com respiro lateral e superior na tampa, de (10 x 19 x 28 cm) com capacidade volumétrica de 5 L, com papel filtro ao fundo, e a sua dieta foi composta por grãos de soja, amendoim e de girassol somados as vagens de feijão, até atingirem o estágio desejado para realização dos experimentos.

3.2 OBTENÇÃO DOS PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus thuringiensis* E TRATAMENTOS UTILIZADOS

Os produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* utilizados foram obtidos juntamente com empresas parceiras, além das testemunhas, suas subespécies/isolados ou ingredientes ativos, bem como as suas respectivas dosagens recomendadas em bula pelo fabricante e pelo MAPA, e volume de calda utilizadas no presente trabalho, estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Nome comercial, isolados/ingrediente ativo e dosagem dos produtos utilizados para a montagem dos bioensaios.

Tratamentos	Nome comercial	Isolados/subespécie/ ingredientes ativos	Dosagem/ha*
T1	Água destilada (Testemunha negativa)	-	-
T2	Acera [®]	<i>aizawai</i> (1641 e 1644)	1000 mL
T3	BT Control [®]	<i>kurstaki</i> HD1 (CCT 1306)	1000 mL
T4	BT Turbo Max [®]	<i>kurstaki</i> HD1	1000 mL
T5	Dipel [®]	<i>kurstaki</i> HD1	500 g
T6	Xentari [®]	<i>aizawai</i> GC-91	500 g
T7	Engeo Pleno S [®] (Testemunha positiva)	Lambda-cialotrina + Tiametoxam	200 mL

* volume de calda de 200 L/ha.

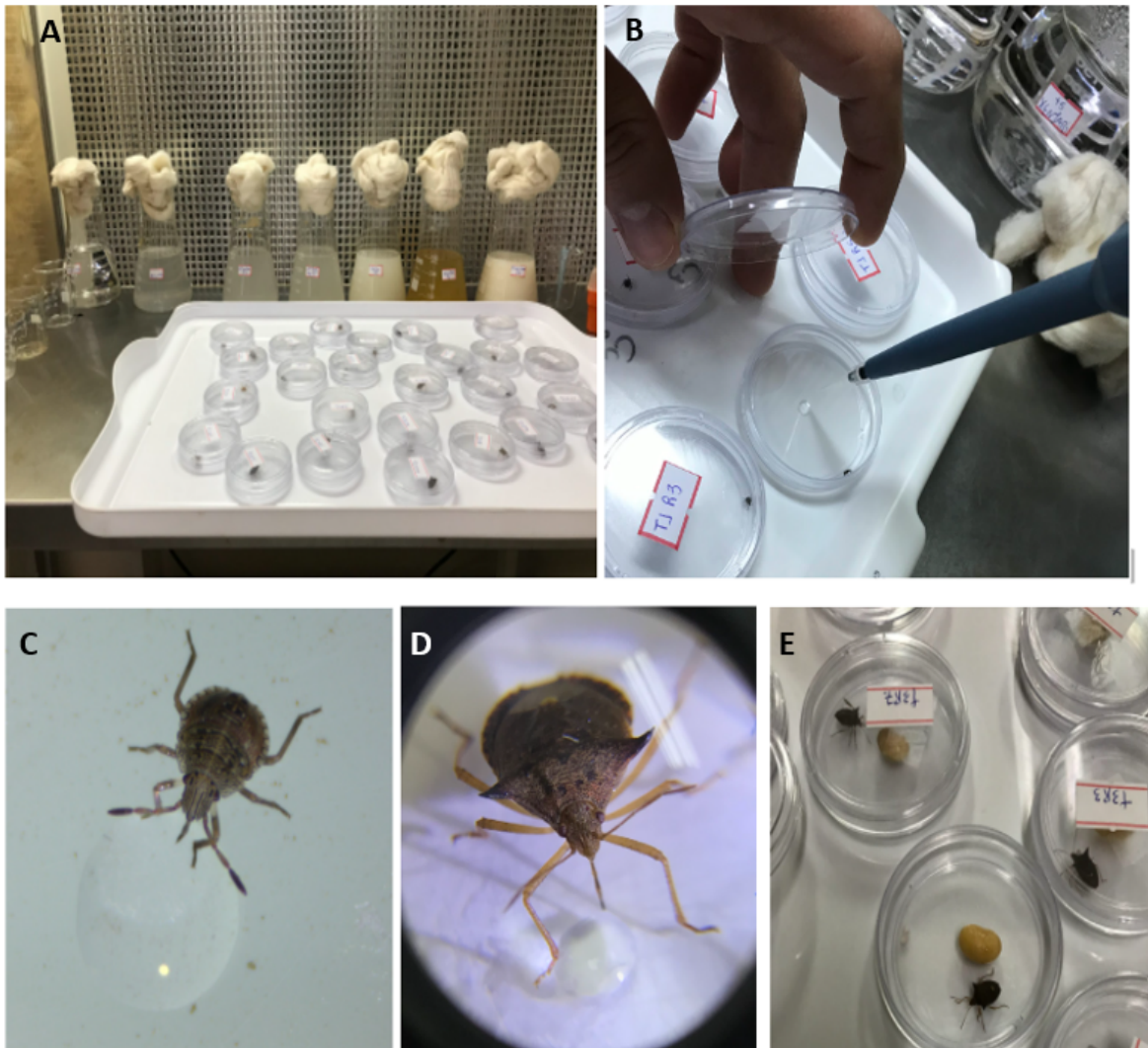
Fonte: Autoria própria, 2022.

3.3 EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Euschistus heros*

Para a realização do bioensaio, a partir da criação, ninfas de 3º instar e adultos de *E. heros*, individualizados em placas de acrílico (60 × 15mm), privados de alimentação por 16 horas. Paralelamente, em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, foram preparadas caldas dos produtos comerciais, na dosagem recomendada em bula pelos fabricantes (Fotografia 1A). Em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de um micropipetador, foi pipetada uma gotícula de 5 µL das caldas e adicionado no fundo das placas de acrílico para os insetos ingerirem o produto diretamente da placa, sem qualquer substrato (Fotografia 1B). Em seguida, a ingestão da gotícula pelo inseto foi confirmada visualmente em todos os indivíduos (Fotografia 1C e D) e, após duas horas do contato do inseto com os tratamentos, em cada placa foi colocado um grão de soja sem tratamento, previamente embebido em água destilada por 24 h. Feito isso, os insetos foram acondicionados em uma sala climatizada, nas condições já descritas (Fotografia 1E).

A avaliação foi realizada diariamente, durante sete dias, quantificando-se o número total de mortos. Nos tratamentos com insetos sobreviventes, a soja foi trocada a cada 48 horas durante a avaliação dos experimentos. A mortalidade foi corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 25 repetições, com cada inseto representando cada repetição.

Fotografia 1: Etapas de preparo do bioensaio com *E. heros*: A) Caldas dos tratamentos preparados e insetos individualizados em placas de acrílico, em câmara de fluxo laminar. B) Aplicação dos tratamentos ao fundo das placas de acrílico. C) Ninfa de 3º instar de *E. heros* ingerindo a gotícula com tratamento. D) Adulto de *E. heros* ingerindo gotícula com tratamento. E) Placas de acrílico com insetos acondicionadas em sala climatizada com grão de soja para alimentação.



Fonte: Autoria própria, 2022.

4 DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos às pressuposições de normalidade nos resíduos (Teste de Lilliefors) e da homogeneidade da variância dos tratamentos (teste de Bartlett). Como não apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Para a comparação da mortalidade entre ninfas e adultos foi utilizado o teste de Mann Whitney, com o auxílio do software R[®] (CRUZ, 2013). Para os gráficos de sobrevivência, foi utilizado a análise de sobrevivência Kaplan-Meier, comparando os tratamentos pelo teste de log-rank. A análise completa foi gerada usando o teste de sobrevivência pacote do software R, com a extensão RStudio (BHERING, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à mortalidade acumulada ao sétimo dia de avaliação, observou-se para o bioensaio com ninfas de 3º instar que os tratamentos com Bt causaram mortalidade, variando de 48% (T2, T3 e T4) a 72% (T5), diferindo significativamente das testemunhas negativa e positiva. Já para adultos de *E. heros* a mortalidade variou de 12% (T2) a 44% (T4 e T6), também diferindo significativamente das testemunhas positiva e negativa, com exceção do T2, que não diferiu da testemunha negativa (Tabela 1). Ao comparar o bioensaio com ninfas de 3º instar com o bioensaio com adultos, verificou-se diferença significativa na mortalidade acumulada entre os bioensaios nos tratamentos com Bt, com exceção do T3 e T4. Houve maior mortalidade no bioensaio com ninfas em comparação com o dos adultos nos tratamentos T2, T5 e T6, onde, variou de 48% para 12% (T2), de 72% para 40% (T5), e de 64% para 44% (T6), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Mortalidade acumulada (\pm EP) de ninfas de 3º instar e adultos de *E. heros* ao longo de sete dias após ingestão dos tratamentos.

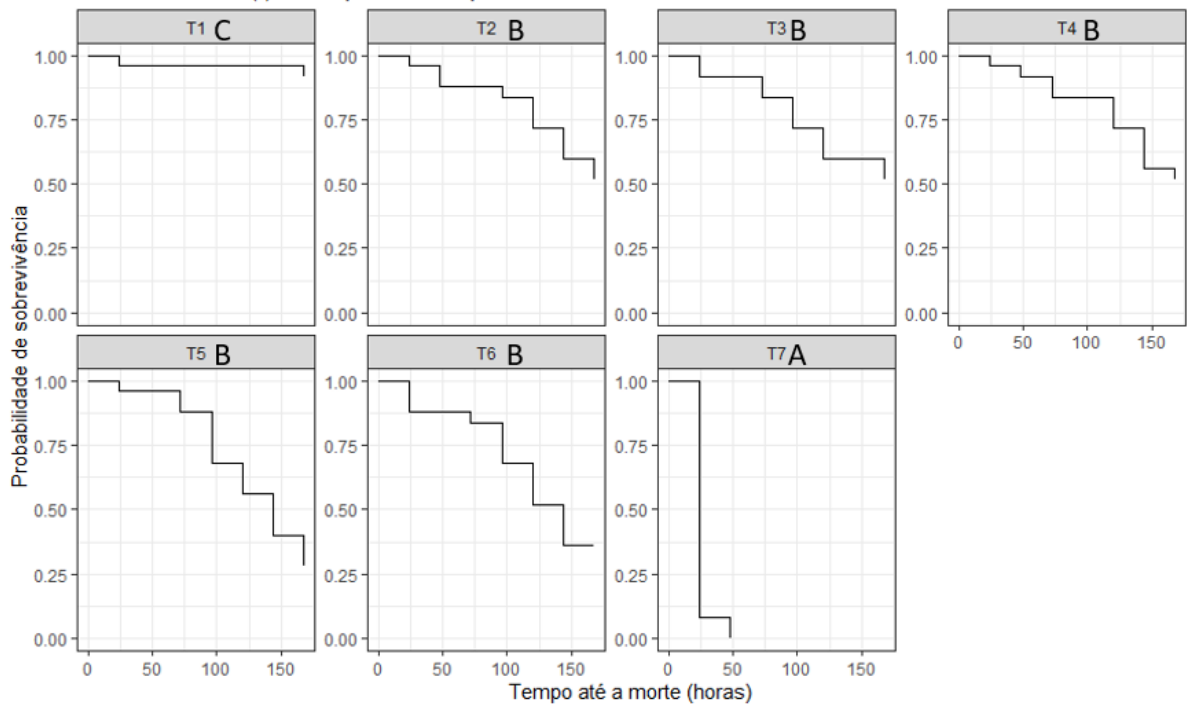
Tratamentos		% Mortalidade acumulada	
		Ninfas 3º instar	Adultos
T1	Água destilada	8,0 \pm 0,20 dA	4,0 \pm 0,25 dA
T2	Acera®	48,0 \pm 0,06 cA	12,0 \pm 0,20 dB
T3	BT Control®	48,0 \pm 0,07 cA	40,0 \pm 0,09 cA
T4	BT Turbo Max®	48,0 \pm 0,09 cA	44,0 \pm 0,13 cA
T5	Dipel®	72,0 \pm 0,09 bA	40,0 \pm 0,00 cB
T6	Xentari®	64,0 \pm 0,13 bA	44,0 \pm 0,08 cB
T7	Engeo Pleno S®	100,0 \pm 0,00 aA	100,0 \pm 0,00 aA
<i>p</i> <		0,05	0,05

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05\%$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: Autoria própria, 2022.

Observando-se a curva de sobrevivência do bioensaio com as ninfas de 3º instar de *E. heros*, verificou-se que a mortalidade iniciou a partir de 24 h após a ingestão dos tratamentos com Bt e se manteve constante até o 7º dia de avaliação, exceto para as testemunhas (Gráfico 1).

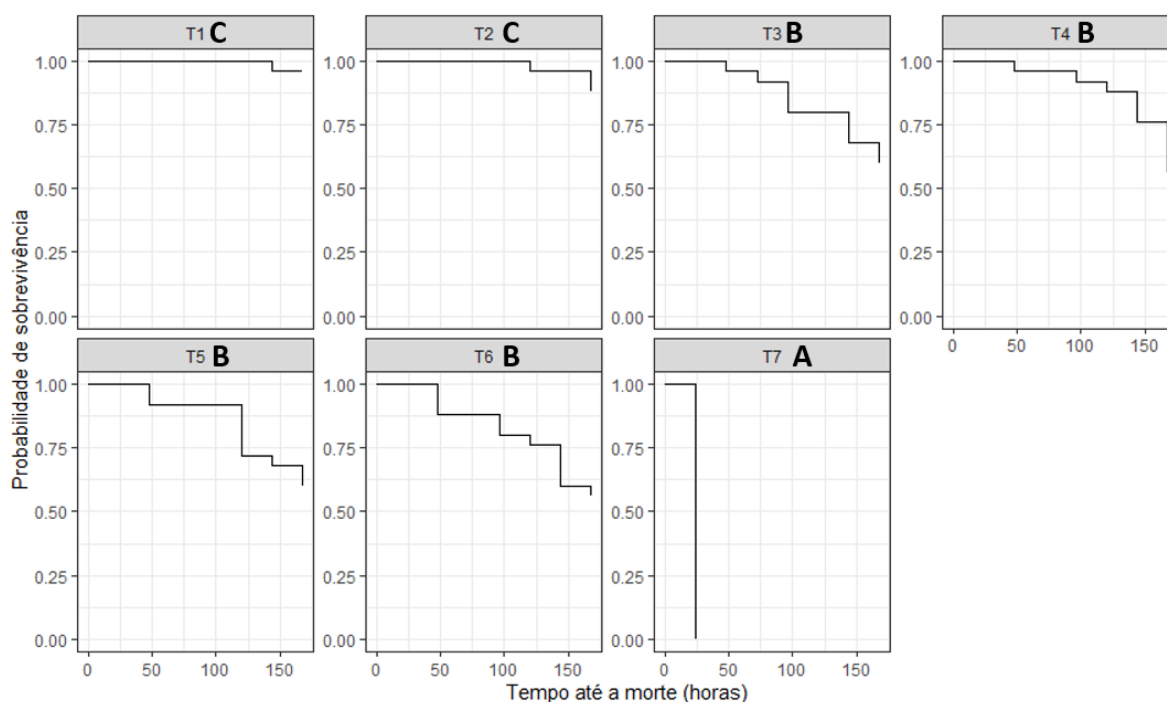
Gráfico 1: Estimativa da S(t) de Kaplan-Meier para dados de *Euschistus heros* de 3º instar ao longo de sete dias.



Fonte: Autoria própria, 2022.

No caso da curva de sobrevivência com os insetos adultos de *E. heros*, a mortalidade nos tratamentos com Bt se iniciou após 48 h da ingestão, e a curva foi menos acentuada, indicando variações entre os tratamentos, exceto para a testemunha negativa e o tratamento 2, que não foi significativo (Gráfico 2).

Gráfico 2: Estimativa da $S(t)$ de Kaplan-Meier para dados de *Euschistus heros* de adultos ao longo de 7 dias.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Em primeiro momento, *E. heros* e Bt parecem não ter muita relação ou demandar maiores investigações por aparentar serem temas e organismos desconexos um do outro. Contudo, os dados obtidos neste estudo evidenciam a patogenicidade de produtos comerciais à base de Bt para ninfas e adultos de *E. heros*, com variação entre as duas fases, indicando potencial de controle do referido patógeno sobre *E. heros*. Além disso, trabalhos já publicados demonstram que os insetos da ordem Hemiptera possuem certa suscetibilidade a alguns isolados e toxinas produzidas por Bt (PORCAR *et al.*, 2009; DORTA *et al.*, 2010; MELATTI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; SATTAR & MAITI, 2011; SALAZAR-MAGALLON *et al.*, 2015; TORRES-QUINTERO *et al.*, 2016; SCHUNEMANN *et al.*, 2018; TORRES CABRA *et al.*, 2019; STEFANELLO, 2021; DA COSTA *et al.*, 2021; DA COSTA *et al.*, 2022). Porém, ainda assim, poucos são os estudos e os conhecimentos acerca dos potenciais efeitos de Bt sobre os pentatomídeos (SCHUNEMANN *et al.*, 2014), estando mais focados nos efeitos que as plantas geneticamente modificadas podem ter em organismos não-alvo ou no terceiro nível trófico da cadeia alimentar (WELLMAN-DESBIENS & CÔTÉ, 2005; CUNHA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014).

Um dos principais impeditivos para a ação de Bt sobre Hemiptera está relacionado ao fato das limitações existentes para que ocorra a ingestão de Bt por Hemiptera, em condições

reais de campo, pois estes insetos possuem aparelhos bucais “picadores sugadores”, que perfuram os tecidos e sugam a seiva (GULLAN & CRANSTON, 2012), ao passo que a bactéria aplicada a campo, encontra-se na superfície da planta. Como Bt atua nas células do mesêntero, a bactéria necessita ser ingerida, assim, o hábito alimentar dos percevejos é um fator comportamental e físico limitante para a ingestão dos cristais proteicos de Bt, no caso dos bioinseticidas. Importante salientar que da mesma forma como nos bioinseticidas, no caso das plantas transgênicas a ingestão também não ocorre, pois os cristais encontram-se nos tecidos e não livres na circulação da planta (floema) (CRISTOFOLETTI *et al.*, 2003).

Outro ponto que deve-se considerar, é a digestão do floema extra-oral realizada pelo inseto, por meio da secreção de saliva contendo proteases, realizando a pré-digestão dos nutrientes contidos na seiva antes destes seguirem para o seu intestino, diminuindo assim o tempo de contato dos cristais com o trato digestivo (CHOUGULE & BONNING, 2012). Por conta disso, a metodologia adotada neste trabalho, de privar os insetos de alimentação por 16 horas seguidas, teve como intuito forçar a ingestão dos cristais de Bt contido nos bioinseticidas, por *E. heros*, condição que não ocorre naturalmente no campo. Partindo desta premissa, investigar quais seriam os efeitos potenciais no caso de Bt entrar em contato com o trato digestivo de *E. heros*, foi o que fundamentou este trabalho.

A ativação proteolítica da toxina de Bt ingerida pelo inseto é essencial para a expressão de sua toxicidade, desta forma, o tipo de enzimas e a abundância relativa destas no seu trato digestivo influenciam significativamente (TORRES & RUBERSON, 2008; CHOUGULE & BONNING, 2012). Com base nisso, uma alternativa para contornar esta limitação, seria a pré ativação/purificação ou pré solubilização das toxinas contidas em Bt, para posterior fornecimento aos insetos, assim facilitando o contato e ação das toxinas no trato digestivo do inseto, conforme comprovam alguns trabalhos que realizaram a sua pré ativação antes de fornecê-las aos percevejos (SCHUNEMANN *et al.*, 2018; DA COSTA *et al.*, 2022). Contudo, tal realidade teria limitação de aplicação a campo, no caso dos bioinseticidas comercializados atualmente.

Quanto aos estudos realizados com Bt e pentatomídeos, Schunemann *et al.* (2018) obtiveram resultados promissores em relação ao potencial inseticida de isolados de Bt sobre *E. heros*. Segundo os autores, em ensaios de interação, a combinação das toxinas Cry2 e Cry9, isoladas e purificadas causaram 98% de mortalidade sobre ninfas de 2º instar, resultado

que foi observado logo no segundo dia após o contato dos insetos com o tratamento. Conforme enfatizam os autores, esses resultados indicam que a combinação de diferentes proteínas Cry pode ter um efeito sinérgico, pois, a presença de dois ou mais genes para toxinas proteicas específicas no mesmo isolado de Bt é muito comum. Nesse viés, a patogenicidade e virulência conferidas pelos isolados estão diretamente relacionadas ao modo de ação das proteínas e como elas vão interagir no intestino do inseto alvo (LEE *et al.*, 1996; FIUZA *et al.*, 2013). Ainda, neste mesmo trabalho, Schunemann *et al.* (2018) testaram os bioinseticidas Dipel® e Xentari®, em avaliação de toxicidade sobre *E. heros*, e não observaram mortalidade significativa sobre insetos de 2º instar. Diferentemente do que fora observado no presente trabalho, onde, Dipel WP® e Xentari WG®, causaram os maiores percentuais de mortalidade acumulada sobre insetos de 3º instar, ao 7º dia de avaliação, com 72% e 64%, respectivamente.

Stefanello. (2021), em avaliação da atividade tóxica de estirpes/isolados de *Bacillus spp.* contra *E. heros* feitas através da inoculação da bactéria via água, de 50 estirpes/isolados avaliados, quatro apresentaram taxas de mortalidade de 100% ao 7º dia após a ingestão, e entre elas três isolados de *B. thuringiensis*. Ainda, em trabalho semelhante, conduzido por Da Costa *et al.* (2022), o efeito e potencial inseticida de diferentes toxinas Cry purificadas para *E. heros* e *Diceraeus melacanthus* Dallas, 1851 (Hemiptera: Pentatomidae) foram avaliadas, fornecidas em dieta líquida artificial. Os autores encontraram duas toxinas (Cry2Ab e Cry4B) ocasionando 80-85% de mortalidade em ninfas de 2º instar de *D. melacanthus* e quatro toxinas (Cry1B, Cry1G, Cry1Ia e Cry2Ab) causando 90-100% de mortalidade em ninfas de *E. heros*, após 7 dias da ingestão. Tais resultados demonstram a maior suscetibilidade dos percevejos pentatomídeos a Bt nos seus instares/estádios iniciais de vida, em detrimento do seu contato com a bactéria enquanto já adultos, corroborando ao que foi observado no presente estudo, em que a mortalidade total acumulada no bioensaio com ninfas de 3º instar foi superior à observada no bioensaio com adultos de *E. heros*.

Apesar do modo de ação das proteínas Bt sobre Hemiptera ainda demandar estudos, os resultados obtidos neste trabalho são primordiais e imprescindíveis para a investigação e conhecimento da patogenicidade de produtos a base de Bt sobre *E. heros*, que já são utilizados no campo. O conhecimento sobre os produtos comerciais à base de Bt sobre percevejos pentatomídeos é estratégico, visto que tais produtos são amplamente utilizados nos

agroecossistemas e, caso encontre-se resultados promissores, como verificado neste estudo, novas estratégias visando o contato de Bt e percevejos a campo podem ser estudados.

Novas pesquisas são necessárias para aprimorar as estratégias de controle de *E. heros*, procurando integrar ferramentas ecologicamente e economicamente sustentáveis, a fim de buscar o equilíbrio dentro do agroecossistema. Investigações acerca da pré-solubilização das toxinas produzidas por Bt e para aplicação destas a nível de campo se fazem necessárias e interessantes, ou até mesmo o desenvolvimento de iscas artificiais em que os insetos seriam atraídos e entrariam em contato com as toxinas da bactéria se tornam possibilidades pertinentes de se investigar e se avaliar. Com a aplicação e efetividade no controle de *E. heros* com Bt, todo o agroecossistema ganharia, visto que com a utilização de um único microrganismo entomopatogênico, seria possível controlar diversas pragas-chave, sejam elas percevejos ou lagartas, de diferentes ordens, famílias, hábitos alimentares, comportamentos e fisiologia. De qualquer forma, a busca e o desenvolvimento destas ferramentas são de suma importância para a agricultura brasileira continuar a evoluir para o caminho da sustentabilidade agronômica, econômica e social.

6 CONCLUSÃO

Os produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* são patogênicos a *E. heros*, sobretudo sobre ninfas de 3º instar, configurando-se potenciais agentes de controle da referida praga.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT WS. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18: 265–266, 1925.
- AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários), 2021. Consulta de Ingrediente Ativo. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
Acesso em: 13 dez. 2022.
- 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.
- ANGUS, T. A. Association of toxicity with protein- crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. **Can. J. Microbiol.**, v. 2, n. 268, p. 122–131, 1956.
- BELCHIOR, D. C. V., *et al.* Impactos de Agrotóxicos no Meio Ambiente. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 34, n. 1, p. 135–151, 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164063/1/Impactos-de-agrotoxicos-sobre-o-meio-ambiente.pdf>>.
- BELL H. A., *et al.* Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera:Pentatomidae), effect of proteinase inhibitors. **European Journal of Entomology** 102: 139–145, 2005.
- BERTI-FILHO, E.; MACEDO, L. P. M. Fundamentos do controle biológico de insetos-praga. **Natal: IFRN Editora**, p. 141 , 2010.
- BHERING, L. L.. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 187-190, 2017.
- BUENO, A. de F. *et al.* Challenges for adoption of integrated pest management (IPM): the soybean example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5-20, 2021.
- BRAVO, A. *et al.* *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.
- BRAVO, A., *et al.* *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. I.; IATROU,K.; GILL, S. S. (Ed.). *Comprehensive molecular insect science*. **New York: Elsevier**, v. 6, p. 175-206, 2005.
- BRAVO, A., *et al.* Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.
- BUENO, A. F., *et al.* Economic thresholds in soybean integrated pest management: old concepts, current adoption, and adequacy. **Neotropical Entomology**, 42, 439-447, 2013.
- CAB International Centre. The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary. Wallingford: CAB International Centre, p. 40, 2010.

CAPALBO, D. M., *et al.* *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia e meio ambiente. **Viçosa: Folha de Viçosa**, p. 309-350, 2004.

CARRILLO, D., *et al.* Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms. **New York: Springer**, 328 p, 2015.

CHOUGULE, N. P.; BONNING B.C. Toxinas para resistência transgênica a pragas de hemípteros. *Toxinas*. v. 4, p. 405–429, 2012.

CIVIDANES, F. J. Determinação das exigências térmicas de *Nezara viridula* (L., 1758), *Piezodorus guildinii* (West., 1837) e *Euschistus heros* (Fabr., 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) visando ao seu zoneamento ecológico. 1992. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP**, Piracicaba, 1992.

CIVIDANES, F. J.; PARRA, J. R. P. Zoneamento ecológico de *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.) e *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) em quatro estados produtores de soja do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, p. 219-226, 1994.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 10 décimo primeiro levantamento, agosto. 2021.

CORRÊA-FERREIRA, B. S & AZEVEDO, J. Danos em sementes de soja por diferentes espécies de percevejos. *Agricultural and Forest Entomology* 4 : 145 - 150, 2002.

CORRÊA-FERREIRA, *et al.* **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Centro Nacional de Pesquisa da Soja, 1999. EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 24. ISSN: 0100-6703.

COSTA, M. L. M., *et al.* Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Brasília-DF**, v. 27, n. 4, p. 559-568, 1998.

CRISTOFOLETTI, P. T, *et al.* Adaptação do intestino médio e distribuição de enzimas digestivas em um inseto que se alimenta do floema, o pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, v. 49, p.11–24, 2003.

CRUZ, C. D.; Genes: A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CUNHA, F. M, *et al.* Ultrastructure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera:Pentatomidae) fed with prey reared on *Bt*-cotton. **Micron** 43:245–250, 2012.

DA COSTA, F. S. S *et al.* Insecticidal Effect of Cry Toxins Produced by *Bacillus thuringiensis* on *Diceraeus melacanthus* (Dallas, 1851) and *Euschistus heros* (Fabricius, 1798)(Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 9, 2022.

DA COSTA, F. S. S., C., M. T., & M., R. (2021). The Endophytism of *Bacillus thuringiensis* in Cotton Plants at Acquisition and Oviposition by *Bemisia tabaci*. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, 26, 556340. Retrieved from <https://juniperpublishers.com/artoaj/pdf/ARTOAJ.MS.ID.556340.pdf>.

DEBACH, P.; Controle biológico de pragas de insetos e ervas daninhas. Chapman and Hall, Londres, p. 515-547, 1964.

DE MAAGD, R. A., *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, London, v.4, p.9-13, 1999.

DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Uso de inseticidas: contextos e consequências ecológicas. *Agric Hum Values* 24, 281–306, 2007.

DORTA, S. O., *et al.* Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) nymphs. **Insect science**, v. 27, n. 3, p. 519-530, 2020.

FARIA, P., 2017. Biocontrol in Brazil: opportunities and Challenges. **AgroPages: Biopesticide Supplement**. Oct. 2017.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. The baculoviruses. **California: Springer**, p. 33-59, 1997.

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

FIUZA, L. M. *et al.* Receptors and lethal effect of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

FIUZA, L. M., *et al.* *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. 2017.

FONTES, E. M. G.; VALADARES, M. C. **Controle biológico de pragas na agricultura**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 514, 2020. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>

GALLO, D. **Entomologia agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. xvi, 920 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz Queiroz ; 10.) ISBN 85-71-33011-5.

GALZER, W. E; FILHO, A. W. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas**. Laboratório 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.

GONZALEZ-ZAMORA, J. E., *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on developmental and reproductive characteristics of the predator *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) under laboratory conditions. **Environmental Entomology** **36**: 1246–1253, 2007.

GUEDES, R. N. C & CUTLER, C. Hormesis induzida por inseticida e manejo de pragas de artrópodes. **Pest Management Science** **70** : 690 - 697, 2014.

GULLAN, P. J., *et al.* **Os insetos**: um resumo de entomologia . 4. ed. São Paulo: Roca, 2012. 480 p. ISBN 9788572889896.

HANNAY, C. L. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore-forming Bacteria. **Nature**, v. 172, p. 1004, 1953.

HARRISON, R. L., *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Baculoviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, p. 1185-1186, 2018. DOI: 10.1099/jgv.0.001107.

HICKMANN, F., *et al.* *Euschistus crenator* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae): uma nova espécie invasora em campos de soja no Norte do Brasil. **Neotrop Entomol**, v. 50, p. 497–503, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00835-1>.

HOFFMANN-CAMPO, C. B., *et al.* Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

HOFFMANN-CAMPO., *et al.* Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. 30. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 30 ISSN 1516-7860).

<https://vittia.com.br/produto/bt-turbo-max/> Acesso em: 23 jul. 2021.

<https://croplifebrasil.org/noticias/produtos-biologicos-e-agricultura-de-baixo-carbono/> Acesso em: 13 dez. 2022.

https://www.agrolink.com.br/problemas/percevejo-marrom_1953.html Acesso em: 14 dez. 2022.

<https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/45325921/banco-de-microrganismos-r-eune-11-mil-linhagens-de-importancia-agricola> Acesso em: 18 jul. 2021.

ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. ISAAA Brief No. 55, 2020.

LACEY, L. A., *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, n. July, p. 1–41, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>>.

LEE, M. K. *et al.* Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 583-586, 1996.

LI, H., *et al.* Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins CryIAC and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). **J. Invertebr. Pathol.** 107, 69–78, 2011. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.001>.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. D. E. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

LOVEI, G. L., *et al.* Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. **Environmental Entomology**, v. 38, p.293–306, 2009.

MACIEL, R. M. A. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* para *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae) em condições de laboratório e semi-campo. 2019. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

MASCARIN, G. M., *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 165, 46–53, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2018.01.001>.

MATTES, O. Parasitare Krankheiten der Mehlmotenlarven und Versuche uber ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekampfungsmittel. Sitzber. Ges. Beforder. Ges. Naturw. Marburg, v. 62, p. 381-417, 1927.

MELATTI, V. M., *et al.* (2010). Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid *Aphis gossypii*, Glover (Hemiptera: Aphididae). *BioAssay*, 5,1-4. <https://doi.org/10.14295/BA.v5.0.70>.

MEYER, M. C.; *et al.* Bioinsumos na cultura da soja. p.362-414, 2022. ISBN: 978-65-87380-96-4

MORAES, J. S.; *et al.* Impact of soybean injury by *Euschistus heros* (Fabricius, 1794)(Hemiptera: Pentatomidae) on feeding preference and survival of *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792)(Coleoptera: Anobiidae), and on soybean quality maintenance under storage. **Journal of Stored Products Research**, v. 99, p. 102035, 2022.

MOSCARDI, F., *et al.* Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In:Microbes and microbial technology agricultural and environmental applications. **Springer Science Business Media**, Cap. 16. p. 415-445, 2011.

PANIZZI, A. R., *et al.* Insetos que atacam vagens e grãos. **SOJA - Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. Brasília: Embrapa, Cap. 05. p. 859, 2012.

PANIZZI, A. R. History and contemporary perspectives of the integrated pest management of soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**. 42, 119–127, 2013.

PANIZZI, A. R. Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae). In: CAPINERA, J.L. (Ed.). **Encyclopedia of Entomology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420–429, 2014.

PARRA, J. R. P. Controle biológico de pragas no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Ciência e Ambiente** 43: 7-18, 2011.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology** 33: 271-284, 2004.

PARK, Y., *et al.* A coleopteran cadherin fragment synergizes toxicity of *Bacillus thuringiensis* toxins *Cry3Aa*, *Cry3Bb*, and *Cry8Ca* against lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 123, p. 1–5, 2014.

PITTA, R. M., *et al.* Suscetibilidade de *Euschistus heros* (Fabr. 1794) (Heteroptera: Pentatomidae) a inseticidas em Mato Grosso. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, p.1-5, 2018.

POLANCZYK, R. A., *et al.* The American *Bacillus thuringiensis* Based Biopesticides Market. Em: Fiuza L., Polanczyk R., Crickmore N. (eds) *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_11.

POLANCZYK, R. A., *et al.* Manejo de pragas com bactérias entomopatogênicas in: MEYER, M. C.; *et al.* Bioinsumos na cultura da soja. p.362-414, 2022. ISBN: 978-65-87380-96-4.

PORCAR, M., *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* - Endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75, p.4897– 4900, 2009. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-09>.

PORCAR, M., *et al.* Hymenopteran especificidade de *Bacillus thuringiensis* cepa PS86Q3. **Controle biológico**, v. 45, p.427–432, 2008.

SALAZAR-MAGALLON., *et al.* Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. **Bulletin of Insectology**, v. 68, n. 1, p. 103-109, 2015.

SALVADORI, J. R.; SALLES, L. A. B. Controle Biológico dos Pulgões do Trigo. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M. FERREIRA, B. S. C.; BENTO, J. M. S. (Ed.) Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, p. 427-447, 2002.

SATTAR, S.; MAITI, M.K. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. **J. Microbiol. Biotechnol.** 21, 937–946, 2011. <https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05030>.

SCHUNEMANN, R., *et al.* Insecticidal potential of *Bacillus thuringiensis* for the biological control of neotropical brown stink bug. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 2, p. 131–138, 2018.

SCHUNEMANN, R., *et al.* Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture, 2014. ISRNMicrobiology 2014: 135675.

SILVA, G. V., *et al.* No impact of Bt soybean that express Cry1Ac protein on biological traits of *Euschistus heros* (Hemiptera, Pentatomidae) and its egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, p. 285-290, 2014.

SMITH, C. M. Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches. **Dordrecht: Springer**, 423 p, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D.E.; SILVA, J.J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 767-769, 2010

SOSA-GÓMEZ, D. R. Capítulo 10- Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. **Soja - Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. p.673-724, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R., *et al.* Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and methamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**, v.30, p.317-320, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R., *et al.* Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 102: 1209- 1216, 2009.

SOSA-GÓMEZ., *et al.* **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja. p. 100, 2014. (Documentos 269, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

SOSA-GÓMEZ, D. R., *et al.* Prevalence, damage, management and insecticide resistance of stink bug populations (Hemiptera: Pentatomidae) in commodity crops. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 22, n. 2, p. 99–118, 2020.

SOUZA, M. T., *et al.* Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v.23, p.43-49, 1999.

STEFANELLO, A. M. Seleção de estirpes de *Bacillus spp.* tóxicas a *Euschistus heros* (Fabricius, 1798). Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 69 p. Dissertação de Mestrado.

TORRES CABRA, E., *et al.* Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* Colombian native strains against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Journal of Plant Protection Research**, 59, 503-511, 2019. <https://doi.org/10.24425/jppr.2019.131259>.

TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R. Interações da toxina *CryIAc* do *Bacillus thuringiensis* em algodão geneticamente modificado com heterópteros predadores. **Pesquisa Transgênica**, v. 17, p. 345–354, 2008.

TORRES-QUINTERO, M., *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Florida Entomologist**, 99, 639-43, 2016. <https://doi.org/10.1653/024.099.0409>.

VAN LENTEREN, J. C., *et al.* Controle biológico por meio de invertebrados e microrganismos: muitas novas oportunidades. **BioControl** 63, 39–59, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>

VAN LENTEREN, J. C., *et al.* Controle biológico na América Latina e no Caribe: sua rica história e um futuro brilhante. **CAB International, Wallingford**, p. 78-101, 2020.

VIVAN, L. M; DEGRANDE, P. E. Pragas da Soja. Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012, n. 66, p. 155–206, 2011.

WALTERS, F. S.; INGLÊS, L. H. Toxicidade de *Bacillus thuringiensis* - endotoxinas para o pulgão da batata em um bioensaio com dieta artificial. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 1995; 77 (2): 211–216.

WELLMAN-DESBIENS, E.; C. J. Development of a *Bacillus thuringiensis*-Based Assay on *Lygus hesperus*. **Journal of economic entomology**, v. 98, n. 5, p. 1469-1479, 2005.

WRIGHT, M. K. *et al.* Characterization of digestive proteolytic activity in *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 7, p. 717-728, 2006.