



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO *DEL-REI*
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM ENGENHARIA AGRÔNOMICA
CAMPUS SETE LAGOAS**

EMANUELLE VICTORIA D' ASCENÇÃO

**Controle de *Spodoptera frugiperda* com *Bacillus thuringiensis* crescido em
arroz como substrato**

Sete Lagoas, MG

2021

EMANUELLE VICTORIA D'ASCENÇÃO

**Controle de *Spodoptera frugiperda* com *Bacillus thuringiensis* crescido em
arroz como substrato**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Agrônômica.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Ferreira da Silva
Coorientador: Dr. Fernando Hercos Valicente

Sete Lagoas, MG

2021

EMANUELLE VICTORIA D'ASCENÇÃO

Controle de *Spodoptera frugiperda* com *Bacillus thuringiensis* crescido em arroz como substrato

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Agrônômica.

Sete Lagoas, 16 de abril de 2021.

Banca avaliadora:

Dr. Amilton Ferreira da Silva, Orientador — Universidade Federal de São João Del-Rei

Msc. Jéssica Letícia Abreu Martins — Universidade Federal de Viçosa

Dr. Fernando Hercos Valicente — Embrapa Milho e Sorgo

**“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem”**

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por guiar os meus passos e iluminar o meu caminho sempre.

Aos meus pais Márcia Aparecida Costa D'Ascensão e Nildo Messias D'Ascensão, pelo dom da vida, pelo amor dedicado, pelos ensinamentos e pelas emoções compartilhadas a cada conquista.

Ao CHT pelo apoio incondicional, por compartilhar esta caminhada comigo, e torná-la cheia de cores e emoções.

Aos meus amigos pelas palavras de incentivo, pelas risadas, pelo apoio e todos os momentos compartilhados em laboratórios e horas de sol em campo.

A todos os meus professores pelos ensinamentos passados.

A EMBRAPA Milho e Sorgo, e todos os seus colaboradores pela oportunidade de realizar este trabalho e aos colegas pelas risadas, acolhimento, ensinamentos e disposição. Em especial a Jéssica L. A. Martins, que além de colega de profissão e de laboratórios, foi minha colega de quarto e enfim membro desta banca. Obrigada por todo apoio!

A Universidade Federal de São João Del Rei - Campus Sete Lagoas, pela oportunidade de cursar Engenharia Agrônômica.

Ao meu orientador, Dr. Amilton Ferreira da Silva, por me incentivar e impulsionar e me ajudar a ver a luz do túnel.

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente por me permitir e auxiliar na realização deste trabalho.

A todos colegas de laboratórios, técnicos, parceiros, coordenadores e pessoas com quem convivi e trilhei esta jornada.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Importância do controle biológico para o milho	11
2.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	12
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.4 Cultivos de Bt em meios alternativos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Preparo dos inóculos:	15
3.2 Preparo do meio alternativo contendo arroz:	15
3.3 Processo de secagem:	16
3.4 Bioensaios:	17
3.5 Análises estatísticas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	23
6. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais plantados no mundo. Dentre as principais pragas que afetam esta cultura, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é uma das pragas consideradas de maior importância. Nos últimos anos a produção de *Bacillus thuringiensis* (Bt) em meios alternativos vêm crescendo em busca de menor custo de produção para os bioinseticidas. O arroz enriquecido com fontes de carbono e nitrogênio pode ser usado como meio de cultura. Objetivou-se avaliar a eficiência na mortalidade de *S. frugiperda* por *B. thuringiensis* crescido em meio sólido contendo arroz como substrato em lotes com as diferentes pesagens (50, 100, 150 e 200g) com a presença e ausência do processo de secagem. Foi utilizada a cepa 1641 pertencente ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Para cada 50g de arroz, utilizou-se 20 mL de meio Luria Bernati + sais (MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄ e MnSO₄) em sacos de polipropileno, homogeneizados, esterilizados a 120° por 30 minutos e inoculados com 20 mL das suspensões das cepas de Bt previamente crescidas em inóculo semente. O material foi mantido em estufa a 30° C por três dias e acondicionado no freezer em sequência. O processo adicional de secagem foi realizado em pacotes selecionados aleatoriamente em evaporador por distribuição uniforme de temperatura e convecção forçada de bancada. Depois de seco, o material passou por uma moagem e foi mantido em temperatura ambiente. Para os bioensaios, foram pesados 5g de cada tratamento e diluídos em 20 mL de água destilada estéril + Tween. Foi realizada a contagem dos esporos. Das suspensões, foram aplicados 150 µL em dieta artificial e, posteriormente oferecidas às larvas neonatas. Cada tratamento consistiu em 4 lotes, com 4 repetições de cada pesagem, com e sem o processo de secagem contendo 24 larvas. Como testemunha, utilizou-se água destilada estéril + Tween e a mortalidade foi avaliada após sete dias. Pela análise de variância observou-se que houve interação das diferentes quantidades de arroz utilizadas como substrato com ou sem secagem. Verificou-se que o melhor resultado de 97,89% de mortalidade foi obtido no tratamento sem a secagem no substrato de 150g e com o substrato de 100g a mortalidade foi de 95,35% e 86,06% com o arroz seco. Para os níveis de quantidade de arroz em função de secagem ou não, observou-se que houve incremento da mortalidade conforme aumentou-se a quantidade de arroz como substrato até o nível entre 100g e 150g para ambos, com decréscimo a partir desse ponto. A maior concentração de esporos total foi obtida no tratamento sem a secagem com 150g de substrato com $8,25 \times 10^8$ esporos totais/mL e no tratamento seco o substrato com 100g obtendo $8,5 \times 10^7$ esporos totais/mL. Portanto, os meios de cultivo utilizando o arroz como substrato são uma alternativa para o cultivo de *B. thuringiensis*. Os pacotes com substrato com o peso de 100g obtiveram destaque apresentando as melhores médias de mortalidade com e sem o processo de secagem. A produção a partir deste peso até 150g é ideal para ambos os tratamentos.

Palavras-chave: Patologia de insetos, Manejo integrado de pragas, Inóculo, Meio sólido.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is one of the most widely planted cereals in the world. Among the main pests that affect this crop, the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) is one of the most important pests. In recent years, the production of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in alternative media has been growing in search of a lower production cost for bioinsecticides. Rice enriched with sources of carbon and nitrogen can be used as a culture medium. The objective was to evaluate the efficiency in the mortality of *S. frugiperda* by *B. thuringiensis* grown in solid medium containing rice as a substrate in batches with different weights (50, 100, 150 and 200g) with the presence and absence of the drying process. The strain 1641 belonging to the Microorganisms Collection of Embrapa Milho e Sorgo was used. For each 50g of rice, 20 ml of Luria Bernati medium + salts ($MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e $MnSO_4$) were used in polypropylene bags, homogenized, sterilized at 120° for 30 minutes and inoculated with 20 ml of suspensions of Bt strains previously grown in seed inoculum. The material was kept in an oven at 30° C for three days and stored in the freezer in sequence. The additional drying process was carried out in packages selected at random in an evaporator by uniform temperature distribution and forced bench convection. After drying, the material was milled and kept at room temperature. For the bioassays, 5g of each treatment were weighed and diluted in 20 mL of sterile distilled water + Tween. Spore counting was performed. Of the suspensions, 150 μ L were applied in an artificial diet and subsequently offered to neonate larvae. Each treatment consisted of 4 batches, with 4 repetitions of each weighing, with and without the drying process containing 24 larvae. As a witness, sterile distilled water + Tween was used and mortality was assessed after seven days. Through the analysis of variance it was observed that there was an interaction of the different amounts of rice used as substrate with or without drying. It was found that the best result of 97.89% mortality was obtained in the treatment without drying on the substrate of 150g and with the substrate of 100g the mortality was 95.35% and 86.06% with dry rice. For the levels of rice quantity due to drying or not, it was observed that there was an increase in mortality as the quantity of rice as a substrate increased up to the level between 100g and 150g for both, with a decrease from that point on. The highest concentration of total spores was obtained in the treatment without drying with 150g of substrate with 8.25×10^8 total spores / mL and in the dry treatment the substrate with 100g obtaining 8.5×10^7 total spores / mL. Therefore, the culture media using rice as a substrate is an alternative for the cultivation of *B. thuringiensis*. Packages with substrate weighing 100g were highlighted with the best mortality rates with and without the drying process. The production from this weight up to 150g is ideal for both treatments.

Keywords: Insect pathology, Integrated pest management, Inoculum, Solid medium.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais plantados no mundo. São 150 espécies diferentes, e apesar da grande importância na culinária, a maior demanda é pela indústria de ração animal (ABIMILHO, 2020). As expectativas para a cultura na safra 2020/21 brasileira são de uma área total de 18.463,5 milhões de hectares e uma produção estimada de 102,3 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Na Região Sudeste, a área plantada está estimada em 1.079,6 milhões de hectares, sendo que na safra 2019/2020, Minas Gerais foi responsável por 7,6% da produção total nacional, totalizando 7.808,6 milhões de toneladas (MAPA, 2020).

Dentre as principais pragas que afetam esta cultura, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é uma das pragas consideradas de maior importância na cultura do milho, além de causar prejuízos a outras diversas culturas, tais como, soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Seu ataque pode reduzir a produção de grãos em até 52% na cultura do milho, quando o seu manejo é feito de forma inadequada (VALICENTE, 2015). Quando jovem, ela raspa as folhas diminuindo a capacidade fotossintética das mesmas e em estágios mais avançados, pode perfurar as folhas e causar prejuízos, também, nas espigas, reduzindo a produção final de grãos (CRUZ et al., 2013).

Na cultura do milho, durante muito tempo, a lagarta do cartucho teve o seu manejo realizado principalmente com plantas transgênicas e aplicações de inseticidas organossintéticos (MONNERAT et al., 2015). Devido ao uso indiscriminado de alguns produtos químicos, geralmente com o mesmo princípio ativo, e por um longo período no tempo, é comum verificar a redução de sua eficiência, desencadeamento de desequilíbrios populacionais de inimigos naturais e seleção de resistência da praga aos inseticidas utilizados, além de danos ao meio ambiente e à saúde do ser humano (FANCELI, 2015).

Como alternativa de controle desta espécie de lagarta, o uso de produtos biológicos na agricultura brasileira vem sendo altamente incentivado, visando redução de aplicações, evitando a ressurgência de pragas, contaminação do ambiente, desenvolvimento de populações resistentes do inseto e redução do custo de produção total (SANTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2018).

Para o controle biológico é possível utilizar produtos e formulações a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria Gram positiva que durante o processo de esporulação produz um cristal proteico que é tóxico para insetos, esta tem sido utilizada há mais de cinco décadas na agricultura (VALICENTE; SOUZA, 2004). Esta bactéria pode ser cultivada em meio sólido,

líquido e semi-sólido. Pode ser utilizada como constituinte de bioinseticidas, em que esporos e toxinas são pulverizados sobre a planta, ou através da expressão de suas toxinas em plantas transgênicas (FERNANDES et al, 2019). Além disso, vale ressaltar que os produtos biológicos à base da bactéria *B. thuringiensis* são agentes que agem e atuam por ingestão e não por contato (VALICENTE, 2020).

Sabe-se que é necessário para o processo fermentativo que o meio de cultura contenha nutrientes com fontes de nitrogênio, carbono e alguns sais minerais, os quais são necessários para a esporulação (VALICENTE & MOURÃO, 2008; MOURÃO, 2017). Desta forma, é importante ressaltar que os meios de cultura representam parte do custo total da produção de biopesticidas à base de Bt. Portanto, são necessários estudos para avaliar meios alternativos e mais baratos e economicamente viáveis a fim de minimizar os custos para a sua produção (ARAUJO; VALICENTE, 2017).

A elaboração de meios alternativos para a produção de Bt é uma estratégia para minimizar os custos, viabilizando a produção em larga escala. De acordo com Mourão (2017), é necessário para o processo fermentativo que o meio de cultura contenha nutrientes com fontes de nitrogênio, carbono e alguns sais minerais, os quais são necessários para a esporulação.

O uso de arroz como substrato foi um processo inovador de fermentação utilizado por Valicente e Zanasi (2005), no qual este arroz enriquecido com fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais apresentaram um número satisfatório de células vegetativas e alta mortalidade em lagartas sadias de até dois dias de idade. Tal resultado mostra que estes meios alternativos além de apresentarem baixo custo, podem ser utilizados por pequenos, médios e grandes produtores rurais (VALICENTE, 2008). Dito isto, o processo de secagem após a produção do meio alternativo contendo arroz como substrato, entra no sistema como um facilitador para o armazenamento deste meio sólido. Para produzir bioinseticidas em escala industrial, devem-se utilizar processos fermentativos, os quais facilitam a produção e estocagem (MORAES et al. 2001; SERAFINI et al., 2002).

Por conseguinte, objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência na mortalidade de *S. frugiperda* por *B. thuringiensis* crescido em meio sólido contendo 50, 100, 150 e 200g de arroz como substrato enriquecido com fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, com a presença e ausência do processo de secagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância do controle biológico para o milho

As condições tropicais de cultivo no Brasil, seu clima, solos e tecnologias de produção proporcionam a contínua sucessão de culturas ao longo do ano, podendo favorecer a alta incidência de diferentes pragas em todo o ciclo das culturas (VALICENTE, 2015). As expectativas para a cultura do milho na safra 2020/21 brasileira são de uma área total de 18.463,5 mil hectares e uma produção estimada de 102,3 milhões de toneladas (CONAB, 2020).

Os desafios para manejo de insetos considerados pragas para a cultura do milho se renovam com o avanço das tecnologias para controle, bem como com o avanço do cultivo da segunda safra no País (CRUZ et al, 2013). Isso porque muitos dos problemas de pragas do milho são oriundos do que chamamos de “ponte verde”, que é a presença de plantas hospedeiras destes insetos durante todo ano. Esta é uma condição particular dos sistemas tropicais de cultivo do Brasil, onde é possível fazer duas e até mesmo três safras consecutivamente na mesma área. Assim, a infestação de pragas se torna cada vez mais frequente e preocupante (CONTINI et al, 2019).

O manejo integrado de pragas (MIP) é considerado umas das melhores ferramentas de controle de pragas, no qual utilizam-se todas as técnicas de controle apropriadas, seja de natureza química, genética, biológica a fim de manter a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causarem danos econômicos (WAQUIL et al., 2020).

Devido ao uso indiscriminado de alguns produtos químicos, geralmente com o mesmo princípio ativo, e por um longo período é comum verificar a redução de sua eficiência, e até mesmo a perda da tecnologia em algumas regiões, sendo necessário testar a associação entre estes, bem como associações de técnicas, como por exemplo a correta realização de amostragem, escolha da época correta de plantio e de colheita, utilização de diferentes variedades transgênicas, e que expressem preferencialmente diferentes proteínas Bt e com a correta utilização das áreas de refúgio, a adoção de diferentes inimigos naturais e utilização dos biopesticidas para aumentar a eficiência do controle da lagarta do cartucho (FANCELI, 2015).

Tendo em vista os fatores deletérios apresentados pelo controle químico, surgem alternativas como o controle biológico, dada a importância da produção sustentável no cenário econômico e ambiental. Ele, por sua vez, consiste no uso de predadores e inimigos naturais para o controle da praga alvo, e pode ser utilizado em combinação com outros métodos como o químico, e a utilização de plantas geneticamente modificadas para a manutenção das pragas

abaixo do nível de dano econômico (WAQUIL et al, 2020).

Para isto, é possível utilizar produtos e formulações a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria Gram positiva que durante o processo de esporulação produz um cristal proteico que é tóxico para insetos, esta tem sido utilizada há mais de cinco décadas na agricultura. Esta bactéria pode ser cultivada em meio sólido, líquido e semi-sólido. Pode ser utilizada como constituinte de bioinseticidas, em que esporos e proteínas tóxicas são pulverizados sobre a planta, ou através da expressão de suas toxinas em plantas transgênicas (FERNANDES et al, 2019).

2.2 *Spodoptera frugiperda*

A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida popularmente como a lagarta-do-cartucho, é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil. Seu ataque pode reduzir a produção de grãos em até 52% nesta cultura quando o seu manejo é feito de forma inadequada (VALICENTE, 2015). Além de ser uma praga polífaga, podendo causar perdas econômicas em uma variedade de culturas como, soja, feijão, alface, algodão, trigo e mais de 80 espécies de plantas (POGUE, 2002).

A *S. frugiperda* é encontrada em praticamente todos os estados brasileiros, sendo favorecida pelas condições climáticas, pela disponibilidade e diversificação de plantas hospedeiras o ano todo (CRUZ, 2012), tendo sido observado crescimento de sua população nos últimos anos. O ciclo de vida do inseto é completado em 30 dias em condições de laboratório e o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea, sendo que um total de 1500 a 2000 ovos podem ser colocados por uma única fêmea durante todo o seu ciclo de vida (VALICENTE, 2008).

Quando jovem, a lagarta raspa as folhas diminuindo a capacidade fotossintética das mesmas e em estágios mais avançados, pode perfurar as folhas e causar prejuízos, também, nas espigas, reduzindo a produção final de grãos (CRUZ et al., 2013). Seu ataque pode ocorrer desde a emergência, nos períodos iniciais até a fase de pendramento e enchimento da espiga (LIMA et al., 2012).

Na cultura do milho, durante muito tempo, a lagarta do cartucho teve o seu manejo realizado principalmente com plantas transgênicas e aplicações de inseticidas organossintéticos (MONNERAT et al., 2015). Nesse contexto, o MIP é uma estratégia eficiente e mais sustentável para manejo de insetos por possuir pilares de controle cultural, controle comportamental,

controle varietal, controle genético, controle químico, sendo a utilização do controle biológico uma importante tática a ser empregada (VALICENTE, 2015).

2.3 *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) apresenta a forma de um bastonete, Gram-positiva, aeróbica e anaeróbica facultativa, pertencente à família Bacillaceae. É uma bactéria entomopatogênica de ocorrência natural, encontrada no solo, em insetos mortos, grãos armazenados e até mesmo na água. Por ser efetiva contra os insetos alvos e não afetar seus predadores naturais e a saúde humana, uma vez que há a ausência de translocação nas plantas, e um espectro limitado de ação, as toxinas de Bt têm sido utilizadas amplamente na agricultura tanto em aplicações de biopesticidas como em plantas transgênicas (HARDEE et al., 2001).

O Bt durante o processo de esporulação produz um cristal proteico que é tóxico para insetos. Por possuir uma alta variabilidade genética distribuída na natureza, há uma variedade de proteínas com potencial inseticida que podem ser expressas (ESTRUCH et. al, 1996; WARREN et. al, 1998). Desta forma, o modo de ação das proteínas e os mecanismos de ação em insetos podem ser diversos, dependendo do tipo de proteínas expressas pela cepa, da ordem ou espécie do inseto e da presença do esporo (GRAF, 2011; CORNFORTH et al., 2015).

A ação de Bt se dá pela ingestão dos seus esporos e cristais pelas larvas suscetíveis. As atividades destas proteínas são restritas ao trato digestivo dos insetos e apresentam um espectro de atividade altamente seletivo, matando uma estreita faixa de espécies de insetos (BRAVO et al., 2011). Desta forma, o consumo de alimento tratado com estas endotoxinas produzidas pelo Bt geralmente resulta na parada da alimentação de larvas de lepidópteros e, a paralisação do intestino que retarda a passagem de material vegetal ingerido. Quando as larvas se alimentam com altas doses da toxina sofrem uma paralisia geral seguida de morte. Estudos têm demonstrado que as toxinas liberadas e proteoliticamente ativadas no intestino se ligam a sítios de receptores específicos nas membranas das células colunares do intestino médio, formando poros que interferem com o sistema de transporte de íons da célula, seguido por septicemia (CHOMA et. al, 1990; KNOWLES, 1994).

No entanto, estudos mostram sua efetividade contra larvas de lepidópteros, coleópteros e dípteras. Atualmente no Brasil, 30 biopesticidas formulados a base de Bt estão registrados no MAPA (AGROFIT, 2021).

2.4 Cultivos de Bt em meios alternativos

Sabe-se que é necessário para o processo fermentativo que o meio de cultura contenha nutrientes com fontes de nitrogênio, carbono e alguns sais minerais tais como cálcio, ferro, zinco, manganês e magnésio, os quais são necessários para a esporulação (VALICENTE & MOURÃO, 2009; MOURÃO, 2017). Desta forma, é importante ressaltar que os meios de cultura representam parte do custo total da produção de biopesticidas à base de Bt. Portanto, são necessários estudos para avaliar meios alternativos e mais baratos economicamente viáveis a fim de minimizar os custos para a sua produção (ARAUJO & VALICENTE, 2017).

A fonte de carbono além de ser utilizada como substrato para a síntese de compostos celulares é uma fonte de energia. O aumento da concentração de carbono aumenta a biomassa e a quantidade de cristal, mas não interfere nas atividades biológicas. Já a mudança da fonte de carbono propicia alterações nas velocidades de formação de toxinas e mudanças nas principais características bioativas do *B. thuringiensis* (LIMA et al., 2001). O nitrogênio é requerido principalmente para síntese dos aminoácidos das proteínas como também dos ácidos nucleicos.

Várias fontes de carbono a preços reduzidos podem ser usadas, tais como glucose de milho, melão de cana, melão de beterraba e amido de alguns cereais. Como fonte de nitrogênio, podem ser usadas farinha de soja, extrato de soja, levedura e água de maceração de milho. Os sais inorgânicos essenciais são cálcio, zinco, ferro, manganês e magnésio. A atividade tóxica do Bt vai depender do meio e da cepa utilizados (VALICENTE et al. 2007)

O uso de arroz como substrato foi um processo inovador de fermentação utilizado por Valicente e Zanasi (2005), no qual este arroz enriquecido com glucose de milho e farelo de soja e sais minerais ($MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e $MnSO_4$) apresentaram um número satisfatório de células vegetativas e alta mortalidade em lagartas sadias de até dois dias de idade. Tal resultado mostra que estes meios alternativos além de apresentarem baixo custo, podem ser utilizados por pequenos, médios e grandes produtores rurais (VALICENTE, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo dos inóculos:

Para o crescimento de Bt em substrato de arroz, adaptamos uma técnica desenvolvida por Valicente e Zanasi (2005). Nela, o arroz é enriquecido com glucose de milho, farelo de soja e sais minerais ($MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e $MnSO_4$).

Para os testes realizados neste experimento, foi utilizada a cepa 1641 armazenada em glicerol pertencente ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo localizada em Sete Lagoas, MG.

Para a preparação dos inóculos de cada lote, plaquemos 10 μ L da cepa estoque em semeadura de estria simples em meio de cultura Luria Bertani (LB) comercial + ágar, permanecendo em estufa a 30°C por 72 horas em placas de Petri. Realizou-se a raspagem da placa para um meio (pré-inóculo) contendo LB + sais ($MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e $MnSO_4$) em um Erlenmeyer, esterilizado previamente em autoclave a 120°C por 30 minutos, permanecendo por 24 horas em fermentação, em agitador a 200 rpm a 29°C. O meio utilizado para inoculação nos substratos contendo arroz (inóculo semente) foi preparado a partir do pré-inóculo, com tempo de crescimento de 24 horas de fermentação, em agitador a 200 rpm a 29°C, conforme as instruções do protocolo do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo. Realizamos quatro lotes, sendo a quantidade de inóculo semente ajustado a quantidade necessária para as pesagens de arroz de cada lote.

3.2 Preparo do meio alternativo contendo arroz:

Neste experimento utilizamos 50, 100, 150 e 200g de arroz tipo III (com grãos mais quebradiços encontrados no mercado local). Para cada 50 g de arroz foram utilizados 20 mL de meio LB + sais ($MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ e $MnSO_4$) para o enriquecimento inicial do arroz em sacos de polipropileno. Logo após, os sacos foram selados, homogeneizados e esterilizados em autoclave por 30 minutos a 120°C. Em cada pacote, foram usados dois pedaços de fita adesiva em forma de cruz para facilitar a inoculação do Bt, sem contaminações externas.

Em seguida, inoculamos 20 mL (para cada 50g do arroz) das suspensões das cepas de Bt previamente crescidas, com o auxílio de uma seringa, sendo todo o processo realizado em

câmara de fluxo contínuo, com todos os utensílios esterilizados previamente. Os pacotes foram novamente homogeneizados e o material foi mantido em estufa a 30° C por três dias (Figura 1). Após este processo, o material foi mantido em freezer até sua utilização.



Figura 1: a) Frascos contendo os inóculos semente com *B. thuringiensis* após 24h de fermentação; b) Preparação do meio com arroz enriquecido com LB + sais, após selagem e homogeneização; c) Inoculação das suspensões em câmara de fluxo.

3.3 Processo de secagem:

A partir da produção de lotes contendo o Bt crescido em arroz como substrato, alguns pacotes de cada pesagem foram destinados aleatoriamente a um processo adicional de secagem. Este procedimento foi feito em evaporador por distribuição uniforme de temperatura e convecção forçada de bancada, modelo MD 400 da marca Desidratec. A rotação foi de 40 rpm e temperatura média de 30 °C.

Os pacotes para a secagem do material, foram retirados do freezer no momento da secagem e, o conteúdo dos sacos colocados de forma homogênea dentro do equipamento, permanecendo por cerca 24 horas, até a secagem completa (Figura 2). A quantidade mínima observada para o bom funcionamento do equipamento foi de 100g, sendo que para 50g foram utilizados dois sacos aleatórios. Depois de seco, o material passou por uma moagem e foi acondicionado em sacos de polipropileno identificados pela pesagem e pelo lote, permanecendo em temperatura ambiente.



Figura 2: Equipamento contendo *B. thuringiensis* crescido em substrato de arroz em processo de secagem.

3.4 Bioensaios:

Foram pesados 5g de cada tratamento e foram diluídos em 20 mL de água destilada estéril + Tween, sendo as suspensões utilizadas para os bioensaios. Para isto, 150 μ L foram aplicados superficialmente em dieta artificial e, após a secagem do excesso da umidade, foram oferecidas às lagartas neonatas. Foi realizada também a contagem dos esporos feitas em Câmara de Neubauer, de cada suspensão, sendo os resultados obtidos em esporos totais/mL.

Cada tratamento com 50, 100, 150 e 200g de arroz, com e sem o processo de secagem, consistiu em 4 lotes com 4 repetições totalizando 16 observações (Figura 3), cada um contendo 24 lagartas para cada repetição, num total de 96 lagartas por pesagem de arroz, e 480 lagartas por lote. Como testemunha, utilizou-se água destilada estéril + Tween, representada pela dosagem 0 nos níveis. A mortalidade foi avaliada após sete dias (Figura 4).

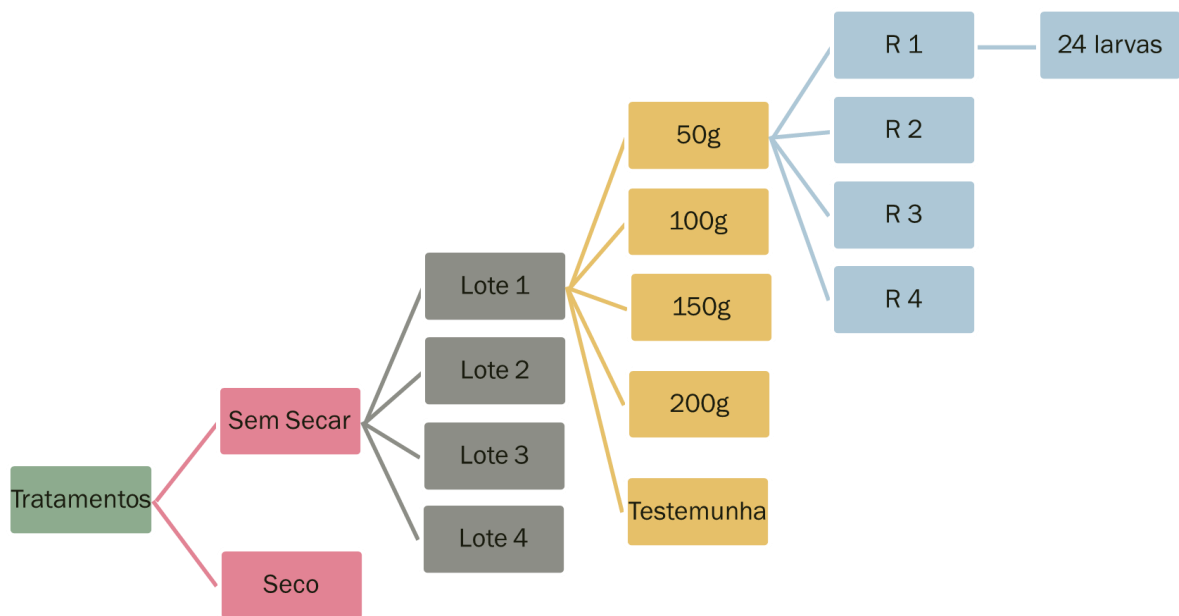


Figura 3: Esquema representativo da quantidade de lagartas neonatas de *S. frugiperda* utilizada por repetição indicando a divisão entre os tratamentos e os respectivos lotes com as pesagens de arroz. (Fonte: Elaborado pela autora, 2021)



Figura 4: Avaliação da mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por *B. thuringiensis* produzido em arroz após 7 dias;

Realizamos também, a contagem dos esporos viáveis, por meio do cálculo da Unidade Formadora de Colônias (UFC), no qual 1,5 mL de cada suspensão que foi utilizada para os bioensaios passou por choque térmico (15 min a 70°C e 5 min no gelo), seguido de seis diluições

seriadas em solução salina a 0,85% (Figura 5), sendo que para a contagem das colônias, foram preparadas duas placas de Petri nas três últimas diluições permanecendo por 24h em estufa a 30°C. Foram consideradas as médias das duas placas contendo entre 30 e 100 colônias em uma das três diluições de cada lote. A concentração foi obtida por meio da fórmula:

$$\text{UFC} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ da contagem das colônias} \times \text{diluição} \times 1000 \text{ (mL)})}{\text{Volume plaqueado (mL)}}$$

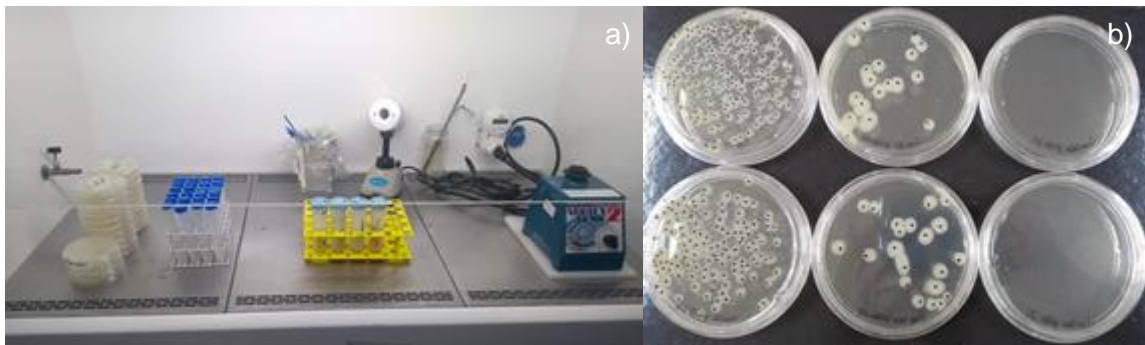


Figura 5: a) Preparação da câmara de fluxo para realização das diluições seriadas das suspensões contendo *B. thuringiensis* crescido em arroz nos diferentes tratamentos; b) Observação e contagem das placas em duplicata, contendo as colônias crescidas por 24h nas três últimas diluições.

3.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2, sendo: 0, 50, 100, 150 e 200g de arroz, com e sem secagem. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F e para as médias de mortalidade foi realizada a comparação pelo teste Tukey e análise de regressão, por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância observou-se que houve interação das diferentes quantidades de arroz utilizadas como substrato com ou sem secagem.

A partir da análise dos dados obtidos foi possível verificar que a maior mortalidade (97,89%) foi obtida no tratamento sem secagem no substrato de 150g. Para os substratos com 100g de arroz os resultados de mortalidade foram de 95,35% sem secar e 86,06% no arroz seco (Tabela 1). Foi possível observar, também, que as maiores mortalidades se encontraram no tratamento sem o processo de secagem, as quais foram acima de 90% para 100, 150 e 200g do substrato de arroz.

Tabela 1: Mortalidade média de lagartas de *S. frugiperda* por *B. thuringiensis* produzido em arroz com e sem secagem e em diferentes quantidades.

	Arroz (g)				
	0	50	100	150	200
Sem secar	1,52 a	68,24 a	95,35 a	97,89 a	90,40 a
Seco	2,65 a	68,94 a	86,09 b	79,04 b	69,82 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não difere entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Para os níveis (pesagens de arroz) em função de secagem ou não (Figura 6), observou-se que houve incremento da mortalidade conforme aumentou-se a quantidade de arroz como substrato até o nível entre 100g e 150g para ambos, com decréscimo a partir desse ponto. No entanto, o maior nível de mortalidade foi alcançado no arroz sem secagem. O ponto de máxima calculado para o tratamento com a secagem foi de 129g enquanto o tratamento sem a secagem foi de 152g.

A maior concentração de esporos totais foi obtida no tratamento sem a secagem com 150g de substrato com $8,25 \times 10^8$, para o tratamento com a secagem foi obtida maior concentração com 100g de substrato $8,5 \times 10^7$. Corroborando com as maiores mortalidades médias observadas entre estas pesagens de substrato. As menores concentrações foram obtidas nos dois tratamentos de 50g e no tratamento seco de 200g (Tabela 2).

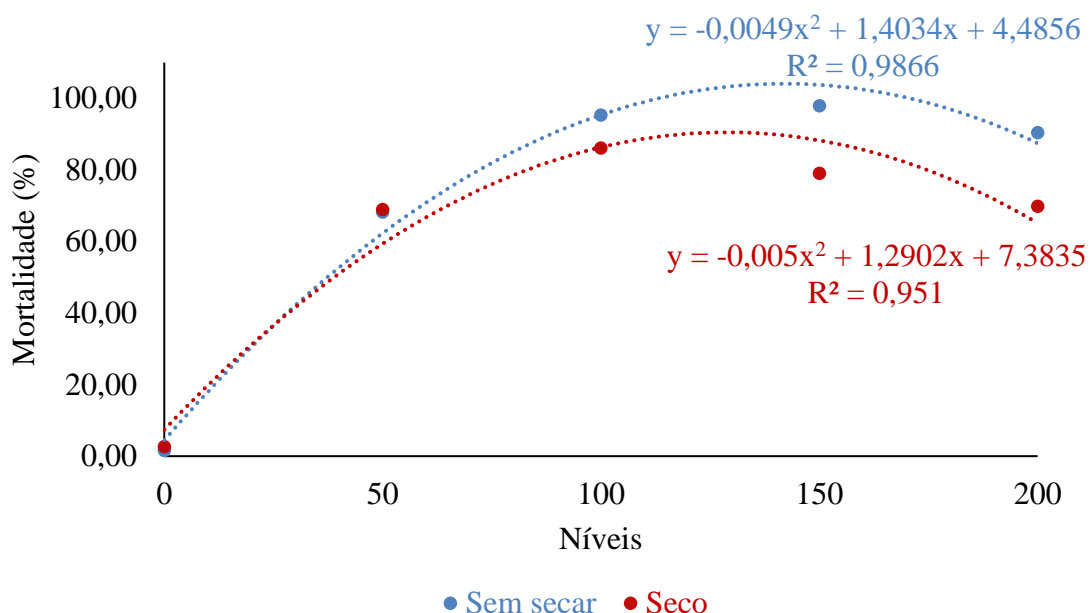


Figura 6: Mortalidade média de lagartas *S. frugiperda* por *B. thuringiensis* produzido em diferentes quantidades de arroz como substrato com e sem processo de secagem;

Tabela 2: Concentrações totais de esporos de *Bacillus thuringiensis* obtidos com o seu crescimento em arroz como substrato com e sem secagem em diferentes quantidades.

Tratamentos	Níveis	Esporos totais/mL	Esporos viáveis totais/mL
Sem secar	0	0	0
Sem secar	50	$1,55 \times 10^7$	$5,20 \times 10^6$
Sem secar	100	$6,7 \times 10^8$	$5,84 \times 10^7$
Sem secar	150	$8,25 \times 10^8$	$8,26 \times 10^7$
Sem secar	200	$4,25 \times 10^8$	$6,52 \times 10^7$
Seco	0	0	0
Seco	50	$1,05 \times 10^7$	$8,8 \times 10^6$
Seco	100	$8,5 \times 10^7$	$5,04 \times 10^7$
Seco	150	$4,25 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$
Seco	200	$1,55 \times 10^7$	$6,24 \times 10^6$

Foi observada uma maior dificuldade para a utilização das suspensões contendo os tratamentos com o processo de secagem. Por serem semelhantes a um pó fino, o material proveniente da moagem do arroz ficava também em suspensão, desta forma houve em alguns momentos o entupimento de algumas ponteiros das pipetas, além da presença de material inerte

no bioensaio. Este efeito não ocorreu com o arroz sem secar, uma vez que, após a homogeneização as soluções com o substrato com os grãos de arroz quebradiços decantam mais rapidamente.

Vários bioensaios já foram realizados com o objetivo de viabilizar o uso de um biopesticida à base de Bt para o controle da lagarta do cartucho. Geralmente, os resultados destes mostram que é possível produzir um biopesticida à base de Bt, a preços muito reduzidos e o produto final chega a matar 100% das larvas testadas. Corroborando com o resultado esperado, Evangelista et. al (2020), em estudos com a produção de Bt em meios alternativos obtiveram acima de 96% de mortalidade em todos os meios estudados.

Desta forma, entende-se que os bioinseticidas constituem uma alternativa aos inseticidas químicos, com menores danos ao meio ambiente e ao consumidor possibilitando o controle de insetos nas lavouras, sendo que estes apresentam uma demanda constante de testes para seleção de isolado e processos eficientes de produção e formulação do produto (PERREIRA; MARTIS, 2016).

As matérias primas mais empregadas como substrato para o crescimento de Bt são farelo de soja, água de maceração de milho, melaço, farelo de semente de algodão, farelo de feijão, caseína e farinha de peixe (COUCH, 2000; BERNHARD & UTZ, 1993). Desta forma, a bactéria pode ser cultivada em meios de culturas provenientes de diversos tipos de matéria prima. O uso de água de milho, vinhaça, glucose de milho, arroz, água de beterraba, fubá, farinha e/ou farelo de soja é uma alternativa viável e econômica na utilização de subprodutos para produção deste patógeno (VALICENTE et al., 2008).

O processo de secagem facilita o armazenamento deste bioinseticida, dispensando a necessidade de permanecer sob congelamento constante, porém reduz as concentrações, uma vez que há uma maior quantidade de material inerte no momento da aplicação.

Segundo Montiel et al. (2001), a quantidade de esporos nem sempre está ligada à entomotoxicidade da cepa, pois, durante a esporulação, cada célula de Bt produz um esporo e um cristal. Sendo que este é o responsável pela letalidade e aquele apenas um indicativo, visto que a contagem de cristais é inviável e dificultosa.

5. CONCLUSÕES

Os meios de cultivo utilizando o arroz como substrato são uma alternativa para o cultivo de *B. thuringiensis*.

Os pacotes com substrato com o peso de 100g destacou-se apresentando as melhores médias de mortalidade com e sem o processo de secagem. A produção a partir deste peso até 150g é ideal para ambos os tratamentos.

Por se tratar de um experimento pioneiro com a secagem do substrato contendo arroz, mais estudos devem ser realizados.

6. REFERÊNCIAS

ABIMILHO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO. **Estatísticas**. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas>. Acesso em: 11 jan. 2021.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**: Consulta Aberta. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso: 03 de jan de 2021.

ARAÚJO, J. B. T.; VALICENTE, F. H. Meios de cultura alternativos para a produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*, para o controle da *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/CNPq, 12., 2017, Sete Lagoas.[Trabalhos apresentados]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017., 2017.

BERNHARD, K., UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis*. Insecticides for Experimental and Commercial Uses. In: Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. John Wiley & Sons Ltd., p.255-267, 1993.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: a história de um bioinseticida de sucesso. **Bioquímica e biologia molecular de insetos**, v. 41, n. 7, pág. 423-431, 2011.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária, safra 2020/21**, Edição grãos, volume 8, Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria>. Acesso em: 11 jan. 2021.

CONTINI, E. et al. Milho: caracterização e desafios tecnológicos. **Brasília: Embrapa. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2)**, 2019.

CORNFORTH, D.; MATTEWS, A.; BROWN, S.; RAYMOND, B. Bacterial Cooperation Causes Systematic Errors in Pathogen Risk Assessment due to the Failure of the Independent Action Hypothesis. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 11. p. 1-13, 2015.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications*. **New York: Kluwer Academic Publishers**, p. 297-316, 2000.

CHOMA C. T.; SUREWICZ W. K.; CAREY P. R.; POZSGAY M.; RAYNOR T. (1990). Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*: Structural implications, *Eur. J. Biochem.* 189: 523-527. 1990.

CRUZ, I. Manjo de pragas na cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (eds) **Tecnologias de produção do milho**. Editora UFV, Viçosa, p.312-366, 2012.

CRUZ, I; et al. Risco potencial das pragas de milho e de sorgo no Brasil. **Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo**, 2013.

CRUZ, I; VALICENTE, F. H.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M. **Risco potencial das pragas de milho e de sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Documentos, n. 150, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/86753/1/doc-150.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2021.

ESTRUCH, Juan J. et al. Vip3A, uma nova proteína inseticida vegetativa *Bacillus thuringiensis* com um amplo espectro de atividades contra insetos lepidópteros. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, pág. 5389-5394, 1996.

EVANGELISTA, N. A.M.; PINHO, J. M. R.; VALICENTE, F. H. Produção de *Bacillus thuringiensis* através de meio de cultivo alternativo. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/CNPq, 18., 2020, Sete Lagoas.[Trabalhos apresentados]. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020., 2020.

FANCELLI, A. L. Visão sistêmica e estratégias de manejo são imperiosos para garantir cultura sustentável. In: FANCELLI, A. L. et al. (Ed.) **A cadeia produtiva do milho**. Revista Visão Agrícola, n. 13, p.58-60, 2015.

FERREIRA, D. F., 2011. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia 35, 1039–1042.

FERNANDES, T. A. et al. **Potencial de isolados de *Bacillus thuringiensis* para controle de fungos fitopatogênicos e promoção de crescimento vegetal**. Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2019.

GRAF, J. Shifting paradigm on *Bacillus thuringiensis* toxin and a natural model for *Enterococcus faecalis* septicemia. **mBio**, n. 2, v. 4, p. 1-2, jul/ago. 2011.

HARDEE, D.D.; VAN DUYN, J.W.; LAYTON, M.B.; BAGWELL, R.D. Bt cotton & management of the tobacco budworm-bollworm complex. **Agricultural Research Service**, Washington, n. 154, p. 40, 2001.

KNOWLES B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.** 24: 275-308. 1994.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Vol. 3, São Paulo, Editora Edgard Blücher. 593 p. 2001.

LIMA, I.S.J.; DEGRANDE, P. E.; PONTES DE MELO, E.; BERTONCELLO, T. F. & SUEKANE, R. Infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho nas condições de sequeiro e irrigado. **Revista Agrarian**, 5: 14-19, 2012.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brasil Projeções do Agronegócio 2019-20 a 2029-30**, 11ª Edição, Brasília, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio_2019_20-a-2029_30.pdf/view. Acesso em: 15 jan 2021.

MONTIEL, M. I. T.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Water Research**, New York, v. 35, p. 3807-3816, 2001.

MONNERAT, Rose et al. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS one**, v. 10, n. 4, p. e0119544, 2015.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, 2001. p. 245-265. 2001.

MOURÃO, A. H. C. **Influência e custos de diferentes meios de cultura para produção de *Bacillus thuringiensis* visando o controle de pragas**. 2017. 31 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

OLIVEIRA, F. Q. de; JACOBSEN, H. G.; ROCHA, D. C. D. da; NEVES, L. de O. **Importância da criação de predadores em laboratório para o avanço do conhecimento e da aplicação do controle biológico em sistema de produção agroecológico**. Cadernos de Agroecologia, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2018.

PEREIRA, Erlon Lopes; MARTINS, Bruna Amaral. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 714-734, 2016.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**. V. 43, p. 1-202, 2002.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M., AZEVEDO, J.L., **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 272 – 290. 2002.

VALICENTE, F. H.; SOUZA, I. R. P. Cultivo e preparo de *Bacillus thuringiensis* para macroscopia eletrônica de varredura. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 1., 2004, Cuiabá, MT. **Da agricultura familiar ao agronegócio: tecnologia, competitividade e sustentabilidade: [resumos expandidos]**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo: Empaer ABMS, 2004.

VALICENTE, F. H.; ZANASI, R. F. Uso de meios alternativos para produção de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis*. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife. Anais: sessão de posteres. Recife: FIOCRUZ, 2005. p. 86., 2005.

VALICENTE, F. H.; LOPES, A. R. de S. & MOURÃO, A. H. C. 2007. **Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* based**

biopesticide. In 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Quebec City – Université Laval. p.77.

VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica**, 2008.

VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. H. C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 702-708, 2008.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S.; PAIVA, C.E.C. Técnicas de produção e uso de entomopatógenos no controle da *Spodoptera frugiperda*. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras.[Londrina]: IAPAR;[Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.

VALICENTE, F. H. Posicionamento e tecnologia de aplicação de inseticidas biológicos. **Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2020.

VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de Pragas na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2015.

WAQUIL, J.M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I. **Manejo Integrado de Pragas**. In: AGEITEC: Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2020. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_69_16820051120.html. Acesso em: 04 fev 2021.

WARREN, G. W. et al. **Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins**. U.S. Patent n. 5,770,696, 23 jun. 1998.