



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

Ensaio de Fermentação para produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner  
1911, a partir da farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) e toxicidade à  
*Aedes aegypti* Linnaeus 1769 e à *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae)

MESSIAS ALEXANDRE PETILLO ALENCAR

MANAUS

2012

MESSIAS ALEXANDRE PETILLO ALENCAR

Ensaio de Fermentação para produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 a partir de farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) e toxicidade à *Aedes aegypti* Linnaeus 1769 e à *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae)

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS

2012

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Alencar, Messias Alexandre Petillo

Ensaio de Fermentação para produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 a partir de farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) e toxicidade à *Aedes aegypti* Linnaeus 1769 e à *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) / Messias Alexandre Petillo Alencar. - Manaus: UFAM, 2012.

81 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

1. *Bacillus thuringiensis* 2. Doenças e pragas - Controle biológico 3. Bioinseticidas 4. Fermentação I. Tadei, Wanderli Pedro (Orient.) II. Astolfi Filho, Spartaco (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007) 615.285.7(043.3)

MESSIAS ALEXANDRE PETILLO ALENCAR

Ensaio de Fermentação para produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 a partir de farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) e toxicidade à *Aedes aegypti* Linnaeus 1769 e à *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae)

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei (INPA)

---

Dra. Eleiúza Litaiff de Abreu (INPA)

---

Dr. Takeshi Matsuura (UFAM)

O maior esteio de humanidade é a família. Sem vocês jamais teria encontrado forças para conseguir ir até o fim. Amo a todos: Paizão, Mãezona, Messias Neto, Messias Lucas, Darinha (minha flor) e Débora (minha amada esposa). A vocês,

**Dedico**

## **Agradecimentos**

Sem vacilar meu primeiro agradecimento é para Deus, pois por sua imensa bondade me presenteou com mais essa vitória tão almejada, na qual pude sentir seu amparo, proteção e companhia em todos os momentos. Obrigado Senhor!

Aos meus pais: José Messias Alencar e Maria Feliz Petillo Alencar, por acreditarem e apoiarem todas as minhas decisões, suprimindo as minhas necessidades sempre da melhor maneira possível.

Os filhos são um presente do Senhor. Agradeço de coração a estas partes de mim, pela compreensão, ajuda, dedicação e amor, ao me permitirem passar horas no laboratório abdicando de suas maravilhosas companhias. Amo vocês: José Messias Alencar Neto, Messias Lucas Pereira Alencar e Dara Feliz Pereira Alencar (Minha Flor).

A minha amada esposa, por sua companhia, compreensão, ajuda, dedicação, amparo, incentivo, amizade e principalmente AMOR, me fazendo perceber a belíssima oportunidade de se recomeçar a cada manhã. Reconheço sua força e determinação, nossa luta já está ganha, e lembre-se sempre estarei do seu lado!

Aos meus irmãos Messias Junior, Jorge Balieiro, Cleonice Petillo e Messias Jofram, o amor demonstrado em cada gesto, presente e palavra serviram de apoio nessa escalada.

A Tia Tête (Tereza de Jesus), sua torcida, carinho, amor e cuidado colaboraram para essa conquista.

A minha sogra (Lulu), minha cunhada (Tia Nise), minhas filhinhas (Kalí e Cocó), sem vocês essa vitória não seria possível.

Àquele que demonstrou além do profissionalismo, mas amizade. Meu orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei, em meio a sua correria (muitas vezes interminável) sempre encontra motivo para sorrir e expulsar o estresse, demonstrando a beleza de viver sorrindo. Sua compreensão, incentivo e orientação foram decisivas nessa vitória. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, por ter acreditado e confiado em minha capacidade, me indicando o caminho inicial do trabalho. Suas palavras de incentivo permanecerão em minha mente.

Ao meu caro amigo Michael Rubem, inundando o ambiente com graça e alegria divinal.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Iléia Brandão Rodrigues, sua incansável dedicação e amor à pesquisa, faz suprir a carência de estrutura e material do laboratório, nos fazendo perceber que vale a pena lutar por aquilo que se acredita.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Ila Maria de Aguiar Oliveira por sua ajuda prestativa a quem nem conhecia (eu), no entanto revelando-se como mais um instrumento de Deus.

A Prof. Dr. Eleilza Litaiff de Abreu e ao Prof. Dr. Takeshi Matsuura (membros da banca de defesa) pelas sugestões e correções no trabalho escrito.

A Sr<sup>a</sup>. Maria do Desterro por está sempre disposta a colaborar e ensinar.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Federal do Amazonas e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela disponibilidade das instalações e capacitação que permitiram a conclusão deste trabalho.

Projeto Rede Malária (CNPq / FAPEAM); Projeto Rede CTPETRO (FINEP / Petrobras) pelos recursos necessários para esta realização.

Ao Instituto Adventista de Manaus (IAM) pela compreensão e liberação nos momentos necessários.

A todos os colegas de laboratório pela ajuda no trato das colônias, coletas e brincadeiras que aliviam a tensão do trabalho e tornam o ambiente mais agradável.

A todos os que direta ou indiretamente oraram, torceram e colaboraram para a conclusão deste trabalho, minha eterna gratidão.

## Epígrafe

“Mas os que esperam no Senhor, renovarão as suas forças, subirão com asas como águias, correrão e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão.”

(Isaías 40: 31)



## Resumo

A utilização de bioinseticidas a base do *Bacillus thuringiensis* nos programas de controle dos vetores de doenças proporciona inúmeras vantagens. Esta bactéria Gram-positiva, aeróbica, em forma de bastonete, produz durante a esporulação inclusões citoplasmáticas cristalinas denominadas proteínas Cry, que apresentam alta especificidade quanto a sua atividade larvicida contra diferentes ordens de insetos, porém mostra-se segura para o homem e minimiza os impactos ao meio ambiente. Nos primeiros estudos visando a produção desta bactéria foram utilizados produtos de baixo custo como componentes para a fermentação submersa, neste processo não há adição de meio de cultura novo no decorrer do crescimento bacteriano, permitindo alterações nas condições físico-químicas do ambiente, favorecendo a produção deste microrganismo, ao estimular sua esporulação quando o meio torna-se inóspito. Neste trabalho empregou-se a fermentação submersa como ferramenta para a produção de um isolado de *Bacillus thuringiensis*, da coleção da UFAM, denominado BtAm 27. No crescimento bacteriano utilizou-se, como fonte de carbono, a farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) hidrolisada com  $\alpha$ -amilase (Thermamyl<sup>®</sup>) e glucoamilase (Novozymes<sup>®</sup>), e também extrato de levedura, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A partir deste meio de cultura obteve-se um fermentado com produtividade de 4,8 g/L de massa seca da bactéria, observando-se que o isolado manteve a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Anopheles* spp.

**Palavras chaves:** Bioinseticida, *Bacillus thuringiensis*, Fermentação, Macaxeira, Hidrólise

## Abstract

The utilization of *Bacillus thuringiensis* based bioinsecticides on disease vector control programs provides countless advantages. This Gram-positive bacterium, aerobic, rod-shaped bacterium, during sporulation produces inclusions crystalline cytoplasmic called as Cry proteins, that shows high specificity larvicide activity against different insect orders. However shows to be safe for a man as well minimize the impacts on the environment. The first studies focus the production of this bacterium. Were used low-cost products as components for submerged fermentation. In this process there is no addition of new culture way during the bacterial growth, allowing alterations on the environment's physic-chemical conditions, favoring the production of this microorganism, by stimulating its sporulation when the medium becomes inhospitable. The present work used submerged fermentation as a tool for the production of a strain of *Bacillus thuringiensis*, from the UFAM collection, called BtAm 27. In bacterial growth was used as carbon source, Cassava (*Manihot utilissima* Pohl) flour hydrolyzed with  $\alpha$ -amilase (Thermamyl<sup>®</sup>) and glucoamilase (Novozymes<sup>®</sup>), and also yeast extract, KH<sub>2</sub>PO, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. From this culture medium a yeast with a yield of 4.8 g/L of bacterium dry mass was obtained and the isolate was found to keep its larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Anopheles* spp.

**Keywords:** Bioinsecticide, *Bacillus thuringiensis*, Fermentation, Cassava, Hydrolysis

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Produtos comerciais de <i>Bacillus thuringiensis</i> para controle de pragas agrícolas (FIUZA & BERLITZ, 2009/2010) .....	19
Tabela 2: Composição do Meio Caldo Nutritivo modificado com adição de sais .....	37
Tabela 3: Composição do Meio Ágar Nutritivo modificado com adição de sais .....	37
Tabela 4: Composição Centesimal da Farinha Torrada (porção de 100g) (TACO, 2006)	43
Tabela 5: Componentes dos meios e concentrações utilizadas no Teste I .....	45
Tabela 6: Planejamento Fatorial Completo 2 <sup>4</sup> .....	46
Tabela 7: Componentes dos meios e concentrações utilizadas no Teste II .....	47
Tabela 8: Matriz DCCR com níveis codificados das variáveis analisadas .....	47
Tabela 9: Componentes e respectivas concentrações (g/L) dos meios de cultura para crescimento do isolado BtAm 27 utilizando o hidrolisado da farinha de macaxeira (Teste III) .....	49
Tabela 10a: Percentual de mortalidade no Teste Seletivo dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> em larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>Anopheles</i> spp.....	51
Tabela 10b: Percentual de Mortalidade de <i>A. aegypti</i> em Bioensaio de Dose .....	52
Tabela 11: Leituras de D.O. para cada experimento do Teste I .....	55
Tabela 12: Leituras de D.O. para cada experimento do Teste II .....	60
Tabela 13: Crescimento avaliado pela massa seca, para os meios de cultura com o hidrolisado da farinha de macaxeira (Teste III) .....	61
Tabela 14: Percentual de mortalidade de <i>A. aegypti</i> e <i>Anopheles</i> spp. em bioensaio seletivo com meios de cultura preparados com hidrolisado da farinha de macaxeira (Teste III) ....	63

## Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismo de Ação da Proteína Cry em Larvas de Lepidóptera ( <a href="http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html">http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html</a> , acessado em 21/10/2012, às 12:54) .....	25
Figura 2: Fluxograma de produção de bioinseticida (DIAS, 1992) .....	33
Figura 3: Colônia de mosquitos mantida no insetário .....	39
Figura 4: Repasto sanguíneo dos mosquitos em hamster .....	39
Figura 5: Copos para oviposição das matrizes contendo ovos de <i>A. aegypti</i> .....	39
Figura 6: Aspecto interno da colônia de <i>A. aegypti</i> .....	39
Figura 7: Bacias de eclosão de ovos .....	39
Figura 8: Sistema para manutenção de <i>Anopheles</i> spp. (oviposição e eclosão dos ovos) ...	39
Figura 9: Montagem do bioensaio seletivo .....	40
Figura 10: Montagem de bioensaio de dose .....	41
Figura 11: Aspecto da embalagem da farinha de macaxeira utilizada como substrato .....	44
Figura 12: Aspecto macroscópico da Farinha de Macaxeira peneirada (Fécula) ( <i>Manihot utilissima</i> Pohl) .....	44
Figura 13: Reta de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com isolado BtAm 27 .....	52
Figura 14: Curva de crescimento celular em meio Caldo Nutritivo (28° C, 160 rpm) .....	53
Figura 15: Crescimento do BtAm 27 em amido 1% .....	54
Figura 16: Gráfico de Pareto para crescimento do Planejamento Fatorial Completo 2 <sup>4</sup> .....	55

Figura 17: Gráfico de Superfície de Resposta para o Crescimento celular obtido no Teste I, relacionando valores codificados da Farinha e Extrato de Levedura .....	56
Figura18: Gráfico de Pareto para crescimento da Matriz DCCR .....	57
Figura 19: Gráfico de superfície de resposta para o crescimento celular obtido no Teste II, relacionando valores codificados para farinha e extrato de levedura .....	58
Figura 20: Gráfico de superfície de resposta para o crescimento celular obtido no Teste II, relacionando valores codificados para farinha e $K_2HPO_4$ .....	59
Figura 21: Gráfico da produtividade (massa seca) utilizando-se os meios de cultura com hidrolisado de farinha de macaxeira (Teste III) Legenda: Concentração de glicose: meios 2, 6 e 10 – 5g/L (vermelho); meios 3, 7 e 11 – 10g/L (verde); e meios 4, 8 e 12 – 10g/L (azul).....	61

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AM – Amazonas;

Bt – *Bacillus thuringiensis*;

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*;

CL<sub>50</sub> – Concentração letal mediana necessária para matar 50% das larvas;

DCT – Diluição da Cultura Total;

D.O. – Densidade Óptica;

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional;

Fsm – Fermentação Submersa ou Simples;

Fss – Fermentação Semi Sólida;

IAC – Instituto Agrônomo de Campinas;

LB – Luria Bertani;

mL – Mililitro;

° C – Grau Celsius;

pb – Pares de Bases;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

PNCD – Plano Nacional de Combate a Dengue;

PTF – *Pore-Forming Toxins* (Proteínas Formadoras de Poros);

rpm – Rotação por Minuto;

spp. – Espécies Variadas;

UTI – Unidades Tóxicas Internacionais;

δ – Delta;

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1. CONTROLE BIOLÓGICO DE MOSQUITOS .....	17
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
1.3. AÇÃO DO <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
1.4. A IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS BIOINSETICIDAS .....	26
1.5. A DENGUE E A MALÁRIA COMO DOENÇAS DE IMPACTO SOCIAL NO BRASIL .....	27
1.5.1. DENGUE .....	27
1.5.2. MALÁRIA .....	29
1.6. FERMENTAÇÃO .....	30
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
2.1. Geral .....	35
2.2. Específicos .....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS .....	36
3.2. CRESCIMENTO E ESTOQUE BACTERIANO .....	36
3.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA .....	38
3.3.1. LARVAS DE <i>A. aegypti</i> E <i>Anopheles</i> spp. PARA O BIOENSAIOS .....	38
3.3.2. BIOENSAIOS .....	40
3.3.2.1. BIOENSAIO SELETIVO .....	40
3.3.2.2. BIOENSAIO DE DOSE .....	41
3.4. ENSAIOS PARA O PROCESSO FERMENTATIVO .....	42
3.4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA UTILIZADA COMO FONTE DE CARBONO .....	42
3.4.2. CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....	43
3.4.3. PREPARO DO INÓCULO .....	43
3.4.4. TESTES DE CRESCIMENTO CELULAR .....	44
<b>4. RESULTADOS</b> .....	50
4.1. ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	50

4.2.	VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA .....	50
4.3.	CRESCIMENTO BACTERIANO .....	53
4.4.	CRESCIMENTO EM AMIDO .....	54
4.5.	TESTES DE FERMENTAÇÃO .....	54
4.6.	ATIVIDADE LARVICIDA DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO .....	62
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS .....	64
5.2.	ATIVIDADE BIOLARVICIDA .....	65
5.3.	TESTES DE CRESCIMENTO EM AMIDO .....	67
5.4.	ENSAIOS FERMENTATIVOS .....	68
5.4.1.	TESTES COM FARINHA DE MACAXEIRA .....	68
5.4.2.	TESTES COM HIDROLISADO DA FARINHA .....	69
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONTROLE BIOLÓGICO DE MOSQUITOS

Segundo ALVES (1998), estima-se que existem cerca de 2,5 milhões de espécies da classe Insecta, dos quais somente um milhão é conhecido, e aproximadamente 10% são pragas. Para BUZZI (2010) encontra-se 828.383 espécies de insetos catalogados, onde 130.000 estão estabelecidas no Brasil. De acordo com o autor, no território nacional ocorrem perto de 500 espécies classificadas como pragas da agricultura ou urbanas. No entanto, este número aumenta gradativamente devido à rápida destruição do ambiente e a introdução de novas espécies exóticas.

No controle destes invertebrados utilizou-se, durante anos, componentes químicos, destacando-se os organofosfatos, carbonatos e piretróides. No entanto, gradativamente a utilização destes produtos tem sido limitada em função dos danos provocados ao meio ambiente, como desequilíbrio ecológico, alterações ambientais e à saúde humana e a de animais. Além disso, o uso inadequado de produtos químicos no ambiente vem resultando constantes casos de resistência em populações de insetos, além do grave desequilíbrio ecológico. Estas são algumas desvantagens da utilização abusiva de inseticidas químicos (ASSUMPÇÃO FILHO & SILVA, 2004; LOPES; ARANTES; CENCI, 2010).

Para minimizar os efeitos negativos da utilização dos produtos químicos, o homem vem buscando alternativas que permitam controlá-las sem causar danos ambientais e, tampouco, para a saúde humana e de animais, de um modo geral. Neste sentido, sobressai-se a utilização de microrganismos com potencial inseticida que, ao mesmo tempo, possibilite o uso racional e seguro para o controle biológico dos insetos pragas e vetores de doenças ao homem (LOPES; ARANTES; CENCI, 2010).

Segundo ALVES (1998), controle biológico pode ser definido como a utilização racional dos patógenos visando a manutenção das pragas a níveis que não afetem a produção agrícola. Este princípio existe naturalmente nos sistemas ecológicos em clímax, permitindo a manutenção do tamanho das populações de determinada espécie através da predação, do parasitismo, da competição e de agentes patógenos produtores de toxinas

capazes de causar enfermidades que venham a repelir ou matar os vetores (SANTOS, 2003; RIBAS; RANGEL; GABRIEL, 2008a).

MARCONDES (2001) destaca a importância da substituição de inseticidas químicos por métodos alternativos e/ou complementares de controle biológico. Neste contexto, os bioinseticidas se destacam para este fim. Entre os microrganismos utilizados no controle de mosquitos, a espécie *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Berliner) é a bactéria mais utilizada, pois produz uma toxina altamente eficiente no controle de larvas de dípteros das famílias Culicidae e Simuliidae. Sua utilização proporciona vantagens como a não poluição do meio ambiente, preservando a maioria da fauna associada (MONNERAT et al., 2000; ESPINDOLA; GUEDES; DE SOUZA, 2008).

O uso comercial do *B. thuringiensis* (Bt) no Brasil iniciou em 1960 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Naquela oportunidade o estado não adquiriu produto suficiente que permitisse sua utilização em grande escala. No entanto, não foram verificadas diferenças significativas entre a ação e a efetividade do tratamento químico e o biológico (CAPALBO, 1995). Com o passar do tempo esta realidade mudou, atualmente produtos a base de Bt são produzidos e comercializados no mundo todo e correspondem a cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas, tendo Estados Unidos e Canadá como líderes, respondendo por 50% da produção mundial (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Recentemente, FIUZA & BERLITZ (2009/2010) revelaram diversas empresas envolvidas na produção e comercialização de vários produtos à base de *B. thuringiensis* (Tabela 1), alguns em âmbito nacional (CAPALBO et al., 2001; MONERRAT et al., 2008; RIBAS; RANGEL; GABRIEL, 2008b; SOCCOL et al., 2009; VALICENTE, 2010; WOLFF; SANTOS; MELO, 2009), outros em escala mundial (MAEDOWS; ELLIS; JARRETT, 1996), no entanto a maioria é utilizada em agrossistemas para controle de pragas agrárias.

Esta nova realidade revela os crescentes e otimistas investimentos na busca por propostas ecologicamente corretas, contra vetores das mais variadas doenças. ALVES (1998) descreve algumas vantagens associadas à utilização de patógenos para o controle de insetos, capazes de explicar esta realidade atual:

a) Especificidade e seletividade;

Por apresentarem grande especificidade quanto ao organismo-alvo, o uso de inseticidas biológicos, mesmo que aplicados em doses elevadas, não vem demonstrando desequilíbrios ecológicos, por não afetarem os parasitos, predadores e polinizadores.

Tabela 1: Produtos comerciais de *Bacillus thuringiensis* para controle de pragas agrícolas (FIUZA & BERLITZ, 2009/2010).

<i>Produtos</i>	<i>Empresas</i>	<i>B. thuringiensis (Bt)</i>	<i>Insetos-alvo</i>
Dipel	Abbott	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Thuricide	Sandoz	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Agree	Mitsui	<i>Bt aizawai</i>	Lepidópteros
Bactur	Milenia Agrociências	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Ecotech Pro	Bayer	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Bactospeine	Solvay	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Javelin	Sandoz	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Foray	Novo-Nordisk	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Biobit	Novo-Nodisk	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Foil/Condor	Ecogen	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Delfin	Sandoz	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Cutlass	Ecogen	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Larvo Bt	Fermone	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Nubilacid	Radonja	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
MVP	Mycogen	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
Bac-control	Agricontrol	<i>Bt kurstaki</i>	Lepidópteros
XenTari	Abbott	<i>Bt aizawai</i>	Lepidópteros
M-One	Mycogen	<i>Bt san diego Bt tenebrionis</i>	Coleópteros
Di-Terra	Abbott	<i>Bt san diego Bt tenebrionis</i>	Coleópteros
Trident	Sandoz	<i>Bt san diego Bt tenebrionis</i>	Coleópteros
Novodor	Novo Nordisk	<i>Bt san diego Bt tenebrionis</i>	Coleópteros
M-One Plus	Mycogen	<i>Bt san diego Bt tenebrionis</i>	Coleópteros
Foil	Ecogen	<i>Bt</i> (recombinante)	Coleópteros
Vectobac,	Abbot	<i>Bt</i>	Dípteros
Skeetal,	Abbot	<i>Bt</i>	Dípteros
Bactimos	Abbot	<i>Bt</i>	Dípteros
Teknar	Sandoz	<i>Bt</i>	Dípteros
Aquabac	Becker Microbials	<i>Bt</i>	Dípteros
LarvX SG	Meridian Precision Realease Technologies	<i>Bt</i>	Dípteros
Biotouch	Zohar Dalia	<i>Bt</i>	Dípteros
Culinex	Culinex Gmbh	<i>Bt</i>	Dípteros
Bacticide	Biotech International Ltda	<i>Bt</i>	Dípteros
Bactivec	Labiofam	<i>Bt</i>	Dípteros
Bt Horus SC	Bthek	<i>Bt</i>	Dípteros

b) Multiplicação, Produção e Dispersão;

Os patógenos possuem a capacidade de permanecer no ambiente através de indivíduos da própria população mesmo em gerações sucessivas, pois se instalam no solo e nas larvas mortas de espécimes contaminados. Resultando, desta maneira, em focos secundários do controle, tornando o produto mais duradouro.

Podem ser cultivados em meios artificiais apresentando alta produtividade de massa celular.

c) Poluição e Toxidade;

A seleção e o manuseio corretos destes produtos não poluem o meio ambiente e são atóxicos para o homem e outros animais.

d) Resistência;

Casos de resistência a bioinseticidas são raros. Estes produtos são preparados com microrganismos ativos contra os insetos-alvo promovendo a eliminação dos indivíduos infectados logo que ocorre a contaminação.

e) Ressurgência de Pragas;

O uso de bioinseticidas microbianos não favorece a ressurgência de pragas secundárias e terciárias, pois não agride o equilíbrio ecológico.

Assim, vem-se buscando, além de utilizar o *B. thuringiensis* para o controle de pragas agrícolas, desenvolver e aperfeiçoar produtos, tais como inseticidas biológicos, para o controle de insetos vetores de doenças de impacto social, tais como malária e dengue (SANTOS, 2003; FERNÁNDEZ-LUNA et al., 2010).

## 1.2. *Bacillus thuringiensis*

Descrito pela primeira vez em 1911 por Berliner, o *B. thuringiensis* (Bt) vem sendo, desde então, estudado como alternativa para o controle biológico larval de insetos (POLANCZYK & ALVES, 2003).

É uma bactéria aeróbica, em forma de bastão, Gram-positiva e capaz de esporular-se quando em carência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis. Durante o processo de esporulação produz um corpo de inclusão cristalina formada por um conjunto de polipeptídios. Um destes é chamado Cry, representada pela forma inativa da  $\delta$ -endotoxinas ou pró- $\delta$ -endotoxinas, a qual apresenta atividade tóxica contra insetos. Outro

componente importante desta inclusão é a proteína Cyt que apresenta alta atividade citolítica e hemolítica, ambas específicas contra larvas de insetos (BAGCHI, 2000; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; POLANCZYK & ALVES, 2003; SOCCOL et al., 2009).

Segundo PINTO et al. (2009/2010), além das proteínas Cry e Cyt, o *B. thuringiensis* ainda produz a proteína Vip, cuja ação inseticida também está relacionada com a formação de poros no intestino médio de insetos susceptíveis. No entanto, ao contrário das proteínas Cry e Cyt, que são produzidas durante a fase de esporulação, a proteína Vip é produzida na fase vegetativa do crescimento microbiano.

O genoma do *B. thuringiensis* apresenta cerca de 2,4 a 5,7 milhões de pares de bases (pb), sendo que muitas linhagens apresentam elementos extracromossomais circulares e lineares. As proteínas Cry são codificadas por genes chamados *cry*, localizados tanto no DNA cromossomal quanto em grandes plasmídeos, ou em ambos. Uma característica comum a estes genes é a sua transcrição na fase estacionária do ciclo bacteriano. A sua atividade tóxica está relacionada com a porção N-terminal das cadeias polipeptídicas codificadas, enquanto que a porção C-terminal influencia na forma da estrutura do cristal (POLANCZYK & ALVES, 2003; SCHNEPF et al., 1998).

A proteína formada a partir do gene *cry* não é em sua totalidade tóxica, apresenta frações que estão envolvidas com sua forma tridimensional que normalmente são digeridas pela larva. Este processo é crucial para a ativação do complexo cristal proteico (PINTO et al., 2009/2010).

As toxinas Cry e Cyt pertencem a um grupo de proteínas chamadas *pore-forming toxins* – PFT (Toxinas Formadoras de Poros). Ao final da esporulação das bactérias, essas proteínas são liberadas no meio e ingeridas por larvas em desenvolvimento neste ambiente. No intestino dos indivíduos susceptíveis, o cristal é solubilizado em pH alcalino, liberando as pró-toxinas que em contato com as enzimas digestivas (proteínases) são convertidas em quatro ou mais polipeptídios tóxicos, as  $\delta$ -endotoxinas (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; POLANCZYK & ALVES, 2003; VALICENTE, 2010)

As toxinas hidrolisadas atravessam a matriz peritrófica da larva, ligam-se a receptores específicos e produzem poros que rompem a membrana entérica. Em seguida invadem o corpo das larvas causando o aumento na absorção de água, lise celular e

eventual ruptura das células do intestino médio. Como consequência desta infecção as larvas para de se alimentar e morrem por inanição (THOMAS & ELLAR, 1983; BAGCHI, 2000; GUIDELLI-THULER et al., 2008; POLANCZYK & ALVES, 2003).

A primeira classificação de *B. thuringiensis* levou em consideração apenas a combinação das sequências de aminoácidos e a atividade inseticida de cada bactéria. Essa classificação agrupou 38 toxinas em 14 classes diferentes, embora ao longo do tempo esta classificação tenha se mostrado ineficaz (SILVA, 2011).

CRICKMORE et al. (1998) propuseram uma nova classificação de toxicidade de estirpes baseada na sequência de aminoácidos. Esta classificação vem sendo utilizada ainda hoje, com 68 grupos de gene *cry* em 229 holótipos (CRICKMORE et al., 2012). Estes dados são atualizados periodicamente e disponibilizados no endereço <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt)> Acessado em 03/11/2012 às 22:55:00.

Para esta nova classificação foi adotada uma nomenclatura diferente da estabelecida inicialmente por Hofte e Whiteley em 1989, e atualizada pelo Comitê de Nomenclatura da Delta-Endotoxina de *B. thuringiensis* criado em 1993. Atualmente os nomes das linhagens de *B. thuringiensis* baseiam-se apenas na semelhança entre os aminoácidos que compõem o seu cristal. Descartando a necessidade de testes de bioensaios contra um número crescente de organismos (CRICKMORE et al., 2012).

Os estudos com Bt avançaram a partir de 1970 com a descoberta dos sorotipos H-10 (var. *darmstadiensis*), H-8a; 8b (var. *morrisoni*) e H-14 (var. *israelensis*). Até então se conhecia apenas sua atividade no controle de Lepidoptera. Com essas descobertas verificou-se a eficiência destas linhagens contra larvas de Culicídeos, entretanto sem nenhum efeito em Lepidoptera (HABIB, 1989).

Análises posteriores revelaram o grande potencial da proteína termo-lábil do sorotipo H-14, ocupando, logo em seguida, a categoria de patógeno mais promissor para o controle de larvas aquáticas de Diptera (LECADET et al., 1992; SOCCOL et al., 2009).

### 1.3. AÇÃO DO *Bacillus thuringiensis*

A patogenicidade do *B. thuringiensis* está principalmente associada à proteína cristal produzida durante a esporulação da bactéria. Esta inclusão paraesporal é formada por várias proteínas, entre as quais se destaca a Cry.

O espectro de ação da proteína Cry é extremamente amplo, pode atuar como fungistático (BATISTA JUNIOR et al., 2002), limitar a proliferação de células cancerígenas humanas (YAMASHITA et al., 2005), apresenta atividade nematocida (HU et al., 2010), larvicida contra as ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, além de possibilitar o controle de insetos sociais (CASTILHOS-FORTES et al., 2009/2010; HOFTE & WHITELEY, 1989; IBARRA et al., 2003; PRAÇA et al., 2004).

Segundo FIUZA (2009/2010), a análise do modo de ação dos bioinseticidas favorece o esclarecimento do mecanismo pelos quais estas proteínas agem no interior das larvas e, permite elucidar a especificidade das diferentes toxinas existentes.

Ao se considerar as informações disponíveis sobre o mecanismo de ação das inclusões entomopatogênicas do *B. thuringiensis*, pode-se resumi-las com base em análises reveladas pela histopatologia, logo após a intoxicação em larvas de Lepidoptera (FIUZA, 2009/2010). Na figura 1 consta um sumário do mecanismo de ação da proteína Cry em larvas de Lepidoptera.

Etapas do processo de infecção, conforme figura 1:

- Ingestão dos cristais pela larva
- Solubilização dos cristais em pH alcalino no intestino médio dos insetos, liberando as pró-toxinas.
- Ativação das pró-toxinas pela ação das enzimas digestivas.
- Formação dos fragmentos tóxicos.
- Reconhecimento de receptores específicos situados nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas suscetíveis, permitindo a ligação irreversível entre eles.
- Indução da formação de poros na membrana das células do epitélio intestinal.

- Formação dos poros na membrana das células epiteliais provocando o desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio extracelular.
- Paralisia e morte do inseto, causadas pela destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais, vacuolização do citoplasma e lise celular.

Vários aspectos podem influenciar na toxicidade do isolado de *B. thuringiensis* à espécie alvo. A alcalinidade do sistema digestivo da larva do inseto, a composição das proteínas do cristal e até a presença de receptores intestinais na larva são variáveis diretas da especificidade. Tais fatores não são os únicos na determinação da toxicidade do cristal (FIUZA et al., 1996; FIUZA, 2009/2010; KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994).

Variáveis ambientais também influenciam na eficácia de formulações à base de *B. thuringiensis*. REGIS, SILVA e MELO-SANTOS (2000) mencionam que comprimidos experimentais de Bti C4P1-T, mostraram boa persistência em campo, causando mortalidade em mais de 70% das larvas de *A. aegypti* no prazo de 40 dias após o tratamento em tanques na sombra, e de 25 dias em tanques expostos ao sol.

Ao se analisar os aspectos envolvidos na viabilidade dos produtos a base de *B. thuringiensis*, percebe-se a sua eficiência para o controle biológico de pragas agrícolas e de insetos vetores de doenças. Observando o cenário mundial, verifica-se que a Dengue e a Malária são doenças transmitidas por insetos e, dentre as ações integradas de combate ao vetor, o controle biológico vem mostrando resultados promissores, configurando-se como importante método em uma ação aliada num programa de manejo integrado, com grande eficácia para o controle de suas formas imaturas (TADEI & RODRIGUES, 2002; RODRIGUES et al., 2008).



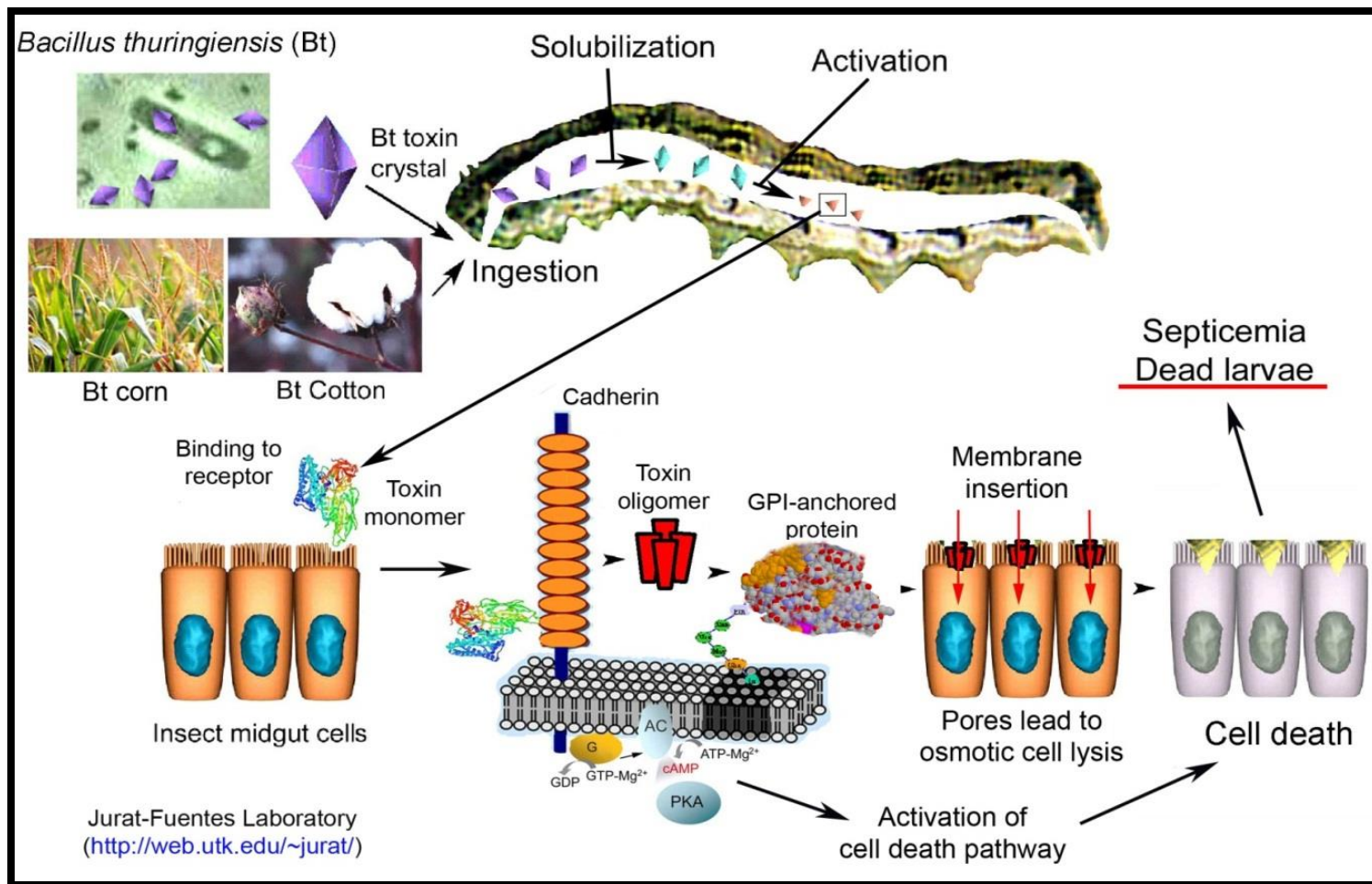


Figura 1: Mecanismo de Ação da Proteína Cry em Larvas de Lepidóptera  
(<http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>, acessado em 21/10/2012, às 12:54)

#### 1.4. A IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS BIOINSETICIDAS

Durante muitos anos a ciência busca mecanismos ecologicamente corretos para o controle vetorial de doenças com amplo impacto social. No norte do Brasil, a Malária e a Dengue se estabelecem como estas doenças, impulsionando pesquisas que visam os seus controles. Neste cenário verifica-se o destaque das pesquisas com as espécies do gênero *Bacillus*, entre as quais, na literatura pesquisada, ganham maior importância o *B. thuringiensis* e o *Bacillus cereus*.

A Dengue ganha destaque no cenário brasileiro como um sério problema de saúde pública, causando preocupação ao governo e a população de vários estados do país. Já a Malária, a cada ano, atinge milhões de pessoas no mundo inteiro causando milhares de mortes principalmente em crianças menores de dois anos. No Brasil 99,98% dos casos estão concentrados nos nove estados da Amazônia Legal: Acre, Rondônia, Amazonas, Roraima, Amapá, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins. O controle destas enfermidades concentra-se no extermínio dos espécimes de *Aedes aegypti* e *Anopheles* spp. tanto na forma imatura quanto na fase adulta. As fêmeas destes mosquitos são vetores destas doenças, respectivamente (POLANCZYK & ALVES, 2003; TADEI et al., 2007).

As fêmeas do *A. aegypti* e as do gênero *Anopheles* spp. são dependentes de água limpa para a postura de ovos e desenvolvimento das larvas. Taxonomicamente, ambas, pertencem à ordem Diptera, família Culicidae. Elas alimentam-se de sangue, inclusive humano, para favorecimento de suas atividades reprodutivas. Ao picarem pessoas portadoras do agente etiológico das doenças transmitidas por elas, contaminam-se, e adquirem a capacidade de transmiti-los durante o repasto sanguíneo humano em pessoas saudáveis. Os mosquitos ao serem contaminados adquirem a capacidade de transmitir seus respectivos parasitas, reiniciando o ciclo de contaminação das doenças.

Para a profilaxia das enfermidades causadas por estes insetos são utilizados inseticidas químicos tanto para o controle vetorial de indivíduos adultos quanto para larvas. Entretanto, o uso intensivo destes agentes químicos resulta em problemas como a resistência ao inseticida, desequilíbrio ecológico e poluição ambiental (POLSON et al., 2011; HABIB, 1989). Estes fatores servem como estímulo para pesquisas que buscam métodos mais eficientes e seguros para o controle dos vetores. Dentre as alternativas

disponíveis destaca-se a utilização de bioinseticidas a base de microrganismos entomopatogênicos (MONNERAT et al., 2008).

Neste cenário, os agentes microbianos recebem maior atenção por se tratar de um mecanismo eficiente e seguro para o combate a insetos vetores de doenças. Fungos e bactérias contam com grandes possibilidades de uso devido à alta eficiência apresentada em laboratório. Os fungos agem por contato e portanto atuam no momento em que o inseto picador/sugador realiza o repasto sanguíneo. As bactérias atuam por via oral, por isso são recomendadas para insetos mastigadores e filtradores, como as larvas de culicídeos e simulídeos (HABIB, 1989).

BACK & BARBAZAN (1994) destacam cinco fatores que foram essenciais para a introdução dos bioinseticidas como alternativa no combate às larvas de insetos:

- a) Alta eficiência contra espécies alvo, causando uma alta mortalidade larval em apenas 24h;
- b) Possibilidade de seletividade dos alvos;
- c) Capacidade da produção em larga escala por processos fermentativos;
- d) Amplo conhecimento da eficiência de uso do *B. thuringiensis* não somente no controle de pestes agrícolas, mais também contra vetores de várias doenças conhecidas;
- e) Necessidade de um larvicida alternativo, para substituir os agrotóxicos utilizados;

Assim, percebe-se a importância de estudos que buscam aperfeiçoar modelos produtivos de bioinseticidas derivados de *B. thuringiensis*, haja vista toda importância social, ambiental e econômica desta bactéria.

## **1.5. A DENGUE E A MALÁRIA COMO DOENÇAS DE IMPACTO SOCIAL NO BRASIL**

### **1.5.1. DENGUE**

A Dengue é uma doença transmitida pela picada de fêmeas do gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae) contaminadas por um dos quatro sorotipos virais causadores do dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), sendo *A. aegypti* Linnaeus (1762) e *A. albopictus* Skuse (1894) os dois vetores mais importantes. O primeiro atuando como vetor principal, e

talvez único nas Américas, enquanto que *A. albopictus* é o vetor secundário presente na Ásia e no Pacífico (SILVA, 2011).

Segundo Boletim Epidemiológico expedido pelo Ministério da Saúde, em 1973 o *A. aegypti* foi erradicado do Brasil, reaparecendo três anos depois (BRASIL, 2002). Posteriormente os primeiros casos de Dengue do país foram notificados no início da década de 80, no estado de Roraima, região norte. Nesta ocasião detectou-se a circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (BRASIL, 2002). As primeiras epidemias brasileiras ocorreram no Rio de Janeiro e em algumas capitais da região nordeste apenas em 1986. Desde então, a dengue vem ocorrendo no país inteiro de forma endêmica, intercalando-se com a ocorrência de epidemias geralmente associadas com a introdução de novo sorotipo em áreas anteriormente isentas do vírus.

Em 2001, O Ministério da Saúde criou o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) iniciou a utilização de produtos biológicos no controle de *A. aegypti*, juntamente com o controle químico, o que vem sendo realizado até os dias atuais (MS 2001; TAUIL, 2002; BRAGA & VALLE 2007).

Segundo a Nota Técnica N.º 118/2010 do Ministério da Saúde desde 2003 o PNCD vinha tomando suas decisões para frentes de trabalho contra o *A. aegypti* baseado apenas em indicadores parciais da real situação da doença. Neste plano não eram incluídas informações epidemiológicas que também pudessem vir a contribuir nas tomadas de decisões para o controle da doença. Variáveis como a complexidade epidemiológica e a existência de outros elementos envolvidos na dinâmica de transmissão, eram negligenciadas (BRASIL, 2010a).

No final do primeiro semestre de 2010, a Secretaria de Vigilância em Saúde / MS desenvolveu uma nova matriz para identificação das áreas de maior vulnerabilidade para transmissão do vírus do dengue. Inicialmente, essa matriz permitiu a identificação de estados com maior potencial de circulação do vírus da dengue, no período de 2010 / 2011. Posteriormente, mais alguns elementos foram incluídos, com vistas a permitir a identificação de cidades e espaços no interior das mesmas com maior vulnerabilidade para ocorrência da doença.

Segundo os dados presentes na Nota Técnica N.º 118/2010 do Ministério da Saúde, o Amazonas é apontado como área de muito risco para o período 2010 / 2011 (BRASIL, 2010a).

Estes dados revelam a urgente necessidade de iniciativas alternativas para o controle desta doença, para que nos próximos anos não venhamos a contabilizar números tão assustadores de casos de Dengue quanto tem sido ano após ano.

### **1.5.2. MALÁRIA**

A malária é uma das doenças mais antigas da humanidade, relatada nos escritos do filósofo grego Hipócrates (460 – 370 a.C.), até hoje ainda causa sérios agravos na saúde pública de vários países tropicais sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento (RODRIGUES, 1996).

É uma doença infecciosa transmitida ao homem durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* contaminadas com o protozoário do gênero *Plasmodium* (BRASIL, 2005). ROCHA (2002) identificou, no Brasil, 14 espécies de anofelinos contaminadas com *Plasmodium* ssp. Esta detecção foi alcançada com testes de radioimunoensaio (IRMA), imunoenzimático com anticorpos monoclonais (ELISA) e teste de infecção experimental. Dentre estas espécies o *Anopheles darlingi*, apresentou maiores índices de contaminação, os quais são reportados desde a década de 1930, em várias localidades brasileiras e na Amazônia. TADEI et al. (1998) destaca esta espécie pela intensidade com que invade as residências para sugar sangue humano.

Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) revelam que 20% da população das Américas vivem em regiões malarígenas ou potencialmente malarígenas. Em 2009, foram registrados 526.000 casos de malária no continente, sendo que 90% ocorreram em quatro países: Brasil, Colômbia, Haiti e Peru.

No Brasil o maior número de casos é registrado na Região Amazônica, onde as condições ambientais e socioculturais favorecem a transmissão da doença. Os últimos dados disponibilizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde revelam a confirmação de 306.908 casos de malária em 2009, sendo que 297.384 casos foram registrados na Região Norte, onde os estados do Amazonas e Pará colaboraram com 66,72% dos resultados positivos (BRASIL, 2010b).

TADEI (2001) e TADEI et al. (2007) enfatizam a necessidade pela busca de métodos alternativos para o controle de anofelinos e prevenção da malária, ressaltando os aspectos entomológicos, a eficiência e versatilidade dos bioinseticidas.

Muitos trabalhos já apresentaram resultados positivos na identificação de bactérias entomopatogênicas ideais para o controle deste vetor, ganhando destaque o *Bacillus sphaericus* (RODRIGUES, 1996; ROCHA, 2002; LITAIFF, 2006; LITAIFF ABREU; TADEI; RODRIGUES, 2011) e o *B. thuringiensis* (REGIS; SILVA; MELO-SANTOS, 2000; FILLINGER; KNOLS; BECKER, 2003; MITTAL, 2003; FERNÁNDEZ-LUNA et al., 2010; TADEI & RODRIGUES, 2002).

Nas proximidades de Manaus aplicações de bioinseticidas, a base de *B. thuringiensis*, já vem sendo adotada como alternativa para o controle de vetores desde 1996 quando TADEI et al. (1996) testaram um produto comercial, obtendo resultados satisfatórios.

Ao se perceber a disponibilidade dos bioinseticidas como alternativa para controle de vetores, vislumbra-se o estabelecimento de um programa que minimize os impactos ambientais, porém eficiente quanto a sua ação tóxica. Atuando no controle não apenas da malária como também de outras doenças de transmissão vetorial.

## **1.6. FERMENTAÇÃO**

Baseado no conhecimento avaliado após décadas de pesquisas e uso operacional de *B. thuringiensis* por todo o mundo, fica claro que os produtos a base desta bactéria apresentam vantagens em relação à utilização de inseticidas sintéticos (REGIS; SILVA; MELO-SANTOS, 2000).

De acordo com PEREIRA JUNIOR; BOM; FERRATA (2008), todos os processos levados a cabo por influência ou participação de agentes biológicos são denominados Bioprocessos. Tradicionalmente conhecidos por processos fermentativos, estes, permitem a síntese de diversos produtos por microrganismos. Considerando as bactérias entomopatogênicas estas podem alcançar índices satisfatórios para produção de inseticidas biológicos (CAPALBO, 1995).

Atualmente o mercado de bioinseticidas corresponde a 5% do mercado mundial de pesticidas, sendo o *B. thuringiensis* participante de 90% das formulações disponíveis neste mercado (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010; CAPALBO et al., 2001).

No Brasil, os primeiros estudos visando produzir  $\delta$ -endotoxinas a partir de preparações de *B. thuringiensis* foram realizados em 1970 na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Nesta ocasião a fermentação foi conduzida por fermentação submersa utilizando produtos de baixo custo como componentes do meio de fermentação (CAPALBO, 1995).

Desde então, tem-se estudado outros mecanismos fermentativos para produção de *Bacillus* entomopatogênicos. No entanto, até o momento a maneira mais viável para obtenção da proteína Cry, ainda é a Fermentação Submersa (Fsm) ou Simples (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). Esta técnica é a forma mais usual de condução de bioprocessos, nela o meio de cultivo recebe a suspensão celular sem adição de meio novo no decorrer do processo. As alterações nas condições internas ao ambiente fermentativo são características neste bioprocessos. Com isso a repressão catabólica é favorecida devido a diminuição do pH em função do consumo de carboidratos e a produção de ácidos orgânicos (PEREIRA JUNIOR; BOM; FERRATA, 2008). Favorecendo a produção de *B. thuringiensis* ao estimular a esporulação da bactéria quando o meio torna-se inóspito.

MORAES (1973, 1976) esclarece o reflexo das condições fermentativas sobre a produtividade da toxina e ressalta a importância da oferta de carbono e nitrogênio, controle do pH e oxigenação, como variáveis indispensáveis para o aumento da produção do cristal. Estes fatores favorecem a utilização da Fsm e impedem que outros processos fermentativos sejam utilizados para esta produção. No entanto, alguns experimentos realizados com Fermentação Semi Sólida (Fss) revelaram a possibilidade de a longo prazo se utilizar esta técnica para a produção de endotoxinas (MORAES; ARRUDA; ERNANDES, 2000; PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007; SANTOS et al., 2006)

De acordo com DIAS (1992), os bioprocessos que envolvem a produção de endotoxinas por *B. thuringiensis* são simples e constituem um fator limitante na redução do custo final do produto (Figura 2). Vários trabalhos já demonstraram que a utilização de componentes de baixo custo, como sub-produtos agrícolas e industriais, tem apresentado

produção satisfatória e custo relativamente reduzido (SOCCOL et al., 2009; ERNANDES & MORAES, 2001; PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Portanto, um biopesticida com alta especificidade, reduzido impacto ambiental e preço competitivo com os adotados pelos inseticidas sintéticos favoreceria a redução dos diversos impactos causados pelo controle químico de insetos.

Cada etapa do processo é essencial para o sistema fermentativo, pois interfere diretamente no resultado final. MORAES; CAPALBO; ARRUDA (1998) estabeleceram as melhores condições para o desenvolvimento de bactérias entomopatogênicas em processos fermentativos. Na visão destes autores a esterelização, agitação/aeração, temperatura de crescimento e manutenção do pH são pontos que devem ser colocados em destaque quando se pensa em fermentação.

MORAES; CAPALBO; ARRUDA (1998) ainda enfatizam que a agitação é diretamente proporcional à biomassa formada, pois fornece o O<sub>2</sub> necessário para a produção do cristal tóxico. Seja em fermentômetros ou em biorreatores, este gás deve ser mantido ao longo de todo processo, pois a esporulação e a produção de endotoxinas são influenciadas pelo seu fornecimento. A interrupção do suprimento de O<sub>2</sub> não interrompe a esporulação, mas prejudica a síntese da toxina cristal reduzindo o rendimento esperado. No entanto, o fornecimento de ar para bioprocessos é um foco de contaminação para o sistema, por isso deve-se cuidar minuciosamente de sua esterilização (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Outro fator limitante para o crescimento bacteriano é a temperatura. MORAES (1976) indica a variação de  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , como sendo a faixa ótima para produção de biomassa com *B. thuringiensis*.

Segundo DIAS (1992), a produtividade de *B. thuringiensis* é aumentada em meios de cultura com alta concentração de carboidratos. Esta bactéria é capaz de metabolizar tanto mono (glicose) como polissacarídeos (amido). Entretanto, o metabolismo destas biomoléculas proporciona a produção de ácidos orgânicos, reduzindo significativamente o pH, sendo que valores abaixo de 5,4 interrompem o crescimento da bactéria. O mesmo autor aconselha que uma das alternativas para este controle é a disponibilização de altas concentrações de nitrogênio (proteínas), pois este, quando consumido, estimula o



crescimento e libera bases orgânicas capazes de aumentar o pH, mantendo-o em níveis desejáveis.

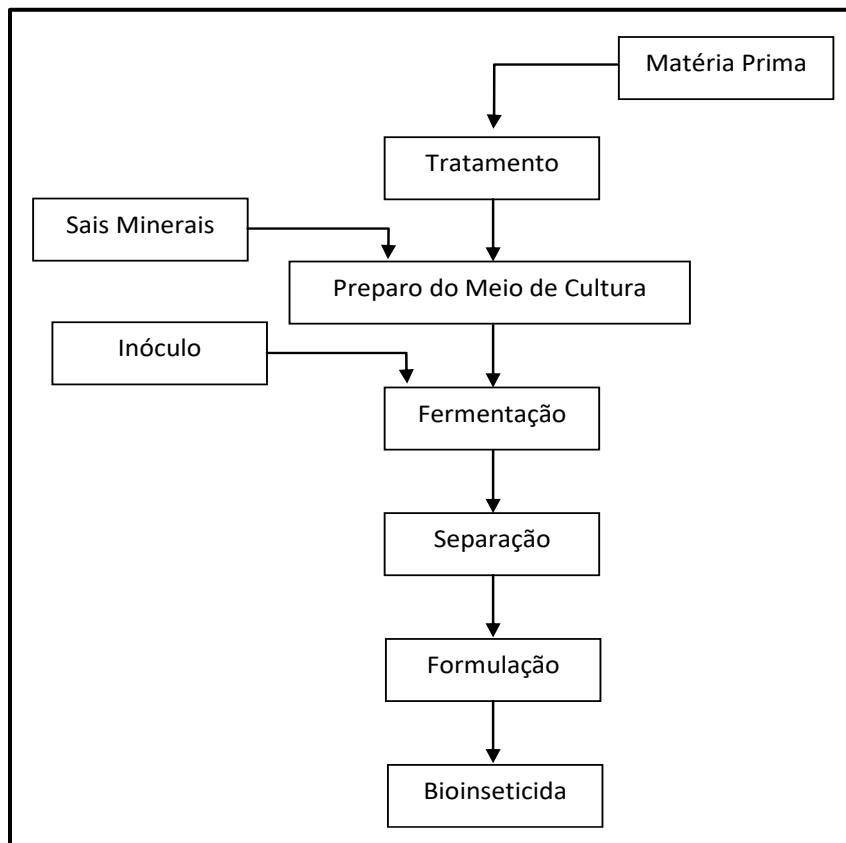


Figura 2: Fluxograma de produção de bioinseticida (DIAS, 1992).

PELIZER; PONTIERI; MORAES (2007) estabelece a utilização de sobras agroindustriais como uma alternativa viável para produção de bioinseticidas. Alguns testes já foram realizados com diversos produtos tais como: sangue de aves e suíno, resíduos da indústria de arroz, melaço de cana de açúcar, farelo de soja, soro de leite, farinha de peixe (GERMANI, 1993; MORAES; ARRUDA; ERNANDES, 2000; PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Segundo DIAS (1992) produtos ricos em açúcares e amido são ideais para o crescimento do *B. thuringiensis* e favorecem a produção deste microrganismo. Observando a matriz produtiva de nossa região percebe-se vários materiais que poderiam ser utilizados como substrato para crescimento desta bactéria em níveis industriais, pois

possuem quantidades significativas de componentes capazes de ser metabolizados pelo bacilo.

A proposta deste trabalho é utilizar a farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) como fonte de carbono para fermentação por *B. thuringiensis*. Visando com isso a produção de um bioinseticida ativo contra larvas de vetores. Este trabalho é pioneiro e servirá como base para utilização de outros resíduos gerados em nossa região tais como tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), a casca da banana (*Musa* spp.), farinha de peixe, entre outros.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Estudar parâmetros para a produção de *B. thuringiensis*, com ação tóxica em larvas de Diptera, em ensaios de fermentação a partir do desenvolvimento de um meio de cultura à base de farinha de macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl).

### **2.2. Específicos**

- Definir a proporção da farinha de macaxeira, como fonte de carbono, em fermentação líquida para o cultivo de *B. thuringiensis*;
- Avaliar o crescimento microbiano em massa seca de *B. thuringiensis* produzida em meio de cultura à base de hidrolisado de farinha de macaxeira e;
- Testar a toxicidade do *B. thuringiensis*, crescido em meio líquido a partir da farinha de macaxeira em larvas de *A. aegypti* e *Anopheles* spp.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

As estirpes utilizadas neste estudo pertencem à coleção de *B. thuringiensis* da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Os isolados foram previamente identificados e caracterizados geneticamente por SOUZA FILHO (2005). O autor isolou 800 amostras bacterianas oriundas de diversas fontes, tais como: solo seco, lama, areia, água, insetos mortos, folhas, frutos, plantas e raízes. Destas obteve um índice de 20,6% para *B. thuringiensis*, das quais 10 apresentaram amplificação positiva do gene *cry4*, com o *primer* universal *UnCry4*, que anela com o gene da proteína Cry4, o qual mostra atividade tóxica específica para Diptera. Estas foram as estirpes utilizadas neste trabalho.

#### 3.2. CRESCIMENTO E ESTOQUE BACTERIANO

Os estoques foram reativados em meio de cultura Caldo Nutritivo modificado com adição de sais (Tabela 2) em tubos de ensaio com tampa. O cultivo inicial foi em estufa de cultura bacteriana por 12 h em temperatura de 28° C. Após o crescimento inicial, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Nutritivo modificado com adição de sais (Tabela 3) e mantidos em 28° C durante 72 h e posteriormente estocados a 4°C.

Para verificar a ocorrência de contaminantes nos estoques dos isolados, foram feitas análises quanto à forma característica de cultura de *Bacillus* sp., levando-se em consideração a elevação, forma, cor e aspecto da borda da colônia. Também foram analisadas propriedades celulares em microscópio óptico - tipo de célula vegetativa, motilidade celular e coloração de Gram.

Das placas estoque também foram preparadas lâminas para observação em microscópio de contraste de fase, com aumento de 100 X, para verificação das células vegetativas, ocorrência de esporângios e esporos, bem como a presença de cristais protéicos intracitoplasmáticos.

Para análise da coloração de Gram as amostras bacterianas foram crescidas por 24 h e observadas em microscópio óptico em aumento de 100 X, sob óleo de imersão.

Tabela 2: Composição do Meio Caldo Nutritivo modificado com adição de sais

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i> (g/L)
Caldo Nutriente	8,00
Extrato de Levedura	1,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
CaCO <sub>3</sub>	0,10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,10
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01

Tabela 3: Composição do Meio Ágar Nutritivo modificado com adição de sais

<i>Componente</i>	<i>Concentração</i> (g/L)
Ágar Nutriente	23,00
Extrato de Levedura	1,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
CaCO <sub>3</sub>	0,10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,10
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01

### 3.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

A atividade larvicida das amostras selecionadas foi confirmada por bioensaio seletivo e de dose com larvas de *A. aegypti* e *Anopheles* spp. de terceiro estágio. Os testes foram conduzidos no insetário do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA).

#### 3.3.1. LARVAS DE *A. aegypti* E *Anopheles* spp. PARA OS BIOENSAIOS

As larvas de *A. aegypti* foram criadas a partir de colônia de mosquitos mantida no insetário do Laboratório de Malária e Dengue do INPA (Figura 3)

A oviposição das matrizes foi estimulada por repasto sanguíneo (Figura 4) em hamster (*Mesocricetus auratus*) previamente anestesiados e mantidos no biotério do INPA. Visando à postura dos ovos, foram instalados dentro da colônia copos descartáveis revestidos internamente com papel filtro umedecido com água potável (Figura 5). No interior da colônia, para alimentação dos mosquitos machos, foram mantidos frascos contendo algodão embebido em solução de sacarose a 10% (Figura 6).

Para estimular a eclosão dos ovos, o papel filtro que os continha foi colocado em bacias metálicas esmaltadas, parcialmente preenchidas com água potável e alimento (farinha de fígado bovino) para as larvas recém eclodidas (Fig, 7). As larvas foram mantidas até o terceiro estágio de crescimento (L3) sob condições controladas: temperatura média de  $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ , umidade relativa em torno de 85%, fotofase de 12 horas.

As larvas de *Anopheles* spp. foram igualmente obtidas em colônias de anofelinos no insetário do Laboratório de Malária de Dengue do INPA, cuja origem são coletas em criadouros situados na periferia de Manaus – Zona Leste. Adicionalmente, larvas de *Anopheles* spp. foram obtidas pela desova de fêmeas adultas coletadas em campo (Figura 8).



Figura 3: Colônia de mosquitos mantida no insetário.



Figura 4: Repasto sanguíneo dos mosquitos em hamster.



Figura 5: Copos para oviposição das matrizes contendo ovos de *A. aegypti*.



Figura 6: Aspecto interno da colônia de *A. aegypti*.



Figura 7: Bacias de eclosão de ovos.



Figura 8: Sistema para manutenção de *Anopheles* spp. (oviposição e eclosão dos ovos).

### 3.3.2. BIOENSAIOS

As estirpes de *B. thuringiensis* foram crescidas em Caldo Nutritivo modificado com adição de sais (Tabela 2) a 28°C, sob agitação de 160 rpm, por 72 horas, tempo em que se obtinha aproximadamente 90% de esporulação da bactéria.

Os testes de toxicidade foram montados no laboratório, sob as mesmas condições de temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo mantidos durante a criação das larvas.

#### 3.3.2.1. BIOENSAIO SELETIVO

Os bioensaios seletivos foram preparados utilizando-se três copos descartáveis de 100 mL, contendo em cada um: 1 mL da cultura bacteriana, 10 ml de água destilada, 10 larvas de terceiro estágio para os testes com *A. aegypti* e 5 larvas de terceiro estágio para os bioensaios com *Anopheles* spp., separadamente. Em cada teste manteve-se um controle negativo para cada amostra, no qual era suprimido a cultura bacteriana (Figura 9).

Foram selecionadas as estirpes que causaram 90% ou mais de mortalidade às larvas. Apenas as amostras patogênicas para *A. aegypti* foram testadas em bioensaios com *Anopheles* spp.



Figura 9: Montagem do bioensaio seletivo.



### 3.3.2.2. BIOENSAIO DE DOSE

A partir do critério de seleção utilizado para a avaliação dos bioensaios seletivos, apenas o isolado BtAm 27, foi submetida ao bioensaio de dose. Neste caso, utilizou-se somente larvas de *A. aegypti*.

Para determinação da CL<sub>50</sub>, foram feitas cinco diluições seriadas ( $1.10^{-1}$ ,  $1.10^{-2}$ ,  $1.10^{-3}$ ,  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5}$ ) da cultura bacteriana crescida por 72 horas a 28°C e 160 rpm em Caldo Nutritivo modificado com adição de sais.

Para cada diluição testada foram montadas cinco copos plásticos de 200 mL, contendo em cada um: 99 mL de água destilada, 20 larvas (L3) e 1 mL do caldo bacteriano (Figura 11). Para cada diluição foi preparado um copo usado como controle negativo, nas mesmas condições, mas sem o acréscimo da bactéria. Os bioensaios foram realizados em duplicata, montados em dias alternados, sendo utilizado um total de 200 larvas por dose. Os bioensaios seguiram os critérios estabelecidos por DULMAGE et al. (1990).

O monitoramento dos bioensaios foi realizado em intervalos de 24, 48 e 72 horas após aplicação do bacilo, com a contagem de larvas vivas e mortas. Foram considerados mortos os indivíduos que não responderam com movimentos ao serem tocados por um palito. Após a contagem do número de larvas mortas foi calculada a CL<sub>50</sub> (concentração letal necessária para matar 50% das larvas testadas), através da análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando-se o programa Polo PC (LeOra Software Berkeley, CA).



Figura 10: Montagem de bioensaio de dose.

### 3.4. ENSAIOS PARA O PROCESSO FERMENTATIVO

Os ensaios de crescimento do bacilo foram desenvolvidos em frascos *Erlenmeyers* mantendo a proporção de 1/5 entre volume nominal do frasco e o volume de meio de cultura.

O meio Caldo Nutritivo foi utilizado como meio de cultura padrão (Tabela 2). Para os ensaios de fermentação, utilizou-se o isolado de *B. thuringiensis* BtAm 27.

#### 3.4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA UTILIZADA COMO FONTE DE CARBONO

Segundo LIU & TZENG (1998), algumas linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de crescer utilizando o amido como fonte de Carbono. Ao se analisar a disponibilidade de produtos amiláceos de nossa região percebeu-se o grande potencial da macaxeira (*Manihot utilissima* Pohl) (Tabela 4), pois se apresenta como um produto de fácil acesso e de farta disponibilidade, já que diariamente é gerada uma quantidade significativa de resíduos provenientes da sua comercialização nas feiras e mercados de Manaus.

Tabela 4: Composição Centesimal da Farinha Torrada (porção de 100g) (TACO, 2006)

<i>Constituinte</i>	<i>in natura</i>
Umidade (%)	8,3
Carboidrato (%)	89,2
Fibra Alimentar (%)	6,5
Lipídios (%)	0,3
Proteína (%)	1,2
Cinza (%)	1,0
Cálcio (mg)	76

Para verificação da capacidade de metabolização do amido como fonte de carbono, uma amostra de BtAm 27 foi submetida a crescimento em placa de Petri, contendo meio de cultura preparado com 1% de amido. Após 24h de crescimento, a placa foi corada por vapor de iodo.

### **3.4.2. CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO**

A verificação da cinética de crescimento do BtAm 27 foi estabelecida por contagem de células vegetativas em Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. A concentração inicial foi  $10^5$  cel/mL e a análise durante as dez primeiras horas do crescimento foi feita a cada duas horas, seguindo-se de contagens a cada hora até o declínio do crescimento bacteriano. Demonstrando o início da esporulação do microrganismo.

### **3.4.3. PREPARO DO INÓCULO**

Todos os inóculos foram preparados com meio Caldo Nutritivo modificado com adição de sais (Tabela 2) em frascos sob agitação de 160 rpm, durante 8 h, a 28° C.

O volume do inóculo a ser adicionado no frasco foi em função da sua concentração celular, calculada através da contagem de células em Câmara de Neubauer, e obedeceu a relação determinada pela fórmula seguinte:

$$V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

Onde :

$C_1$  = concentração do inóculo;

$V_1$  = volume necessário;

$C_2$  = concentração necessária no frasco-teste ( $10^6$  cel/mL);

$V_2$  = volume de meio no frasco de cultivo

#### 3.4.4. TESTES DE CRESCIMENTO CELULAR

Durante os ensaios de crescimento bacteriano percebeu-se a incapacidade de metabolização eficiente do amido pela bactéria, sendo necessária a realização de três testes distintos incluindo a hidrólise enzimática da farinha.

A farinha utilizada nos testes foi comprada em um supermercado de Manaus, e apresentada como Farinha de Macaxeira em embalagem de 250 g (Figura 11). A farinha foi peneirada em peneira com 0,101 mm de porosidade, resultando em uma massa semelhante à fécula de macaxeira (Figura 12).



Figura 11: Aspecto da embalagem da farinha de macaxeira utilizada como substrato.

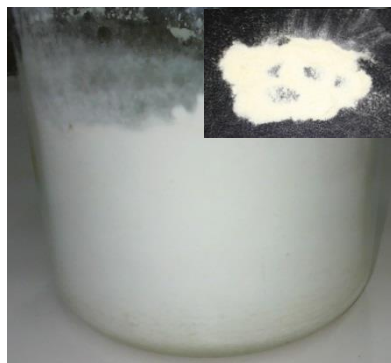


Figura 12: Aspecto macroscópico da Farinha de Macaxeira peneirada (Fécula) (*Manihot utilissima* Pohl)

## Teste I

Inicialmente, foram considerados quatro componentes para o meio de cultura: farinha, extrato de levedura, uréia e  $K_2HPO_4$ , onde para cada um se estabeleceram três concentrações codificadas como -1 (mínimo), 0 (ponto central) e +1 (máximo) (Tabela 5). As concentrações destes componentes em cada meio foram estabelecidas por um Planejamento Fatorial Completo  $2^n$ , onde “n” é a quantidade de fatores avaliados ( $2^4$ ), gerando assim uma matriz experimental com 16 combinações e três repetições do ponto central, totalizando 19 experimentos (Tabela 6). Os meios foram inoculados e crescidos em agitador rotatório a 28°C, a 160 rpm, durante 24 h.

O crescimento bacteriano em cada meio foi quantificado por Densidade Óptica (D.O.) lida em comprimento de onda de 700nm por espectrofotômetro UV-VIS, e analisados no *software Statistica 6.0*. Após análise de efeitos, estabeleceu-se novo planejamento para aperfeiçoamento da composição do meio de cultura.

Tabela 5: Componentes dos meios e concentrações utilizadas no Teste I.

<i>Componentes</i>	<i>Concentrações (g/L)</i>		
	Máxima (-1)	Ponto Central (0)	Mínima (+1)
Farinha	10,00	12,50	15,00
Extrato de Levedura	1,00	1,50	2,00
$K_2HPO_4$	0,10	0,55	1,00
Uréia	0,20	0,60	1,00

Tabela 6: Planejamento Fatorial Completo 2<sup>4</sup>.

<i>Meio de Cultura</i>	<i>Farinha</i>	<i>Extrato de Levedura</i>	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>Uréia</i>
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

## Teste II

Uma nova matriz do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) foi gerada excluindo-se a uréia da composição dos meios. Foram estabelecidas novas concentrações e acrescentados dois pontos axiais para cada fator, totalizando cinco concentrações para cada componente do meio. Para o cálculo dos pontos axiais ( $\alpha$ ), utilizou-se a equação  $\alpha = (2^n)^{1/4}$ , onde “n” equivale ao número de variáveis envolvidas no processo, chegando-se aos valores codificados de  $+\alpha = 1,68$  e  $-\alpha = -1,68$ . As novas concentrações e a matriz estão representadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Os meios foram inoculados e crescidos em agitador rotatório a 28° C, a 160 rpm, durante 24 h. O crescimento bacteriano em cada meio foi quantificado por Densidade Óptica (D.O.) medida a 700 nm em espectrofotômetro UV-VIS, e analisado no *software Statistica 6.0*.

Tabela 7: Componentes dos meios e concentrações utilizadas no Teste II.

<i>Componentes</i>	<i>Concentrações (g/L)</i>				
	Axial (-1,68)	Máximo (-1,0)	Ponto Central (0,0)	Mínimo (+1,0)	Axial (+1,68)
Farinha	1,60	5,00	10,00	15,00	18,40
Extrato de Levedura	0,00	0,60	1,50	2,40	3,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,00	0,20	0,50	0,80	1,00

Tabela 8: Matriz DCCR com níveis codificados das variáveis analisadas.

<i>Meio de Cultura</i>	<i>Farinha</i>	<i>Extrato de Levedura</i>	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	-1	+1
4	+1	-1	+1
5	-1	+1	-1
6	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	0	-1,68
12	0	0	+1,68
13	0	-1,68	0
14	0	+1,68	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0

### Teste III

Finalizando os testes de crescimento foram selecionados, na literatura, três meios de cultivo já utilizados para a produção de *B. thuringiensis*: LOPES; ARANTES; CENCI (2010), SOCCOL et al. (2009) e Caldo Nutritivo modificado com adição de sais. Estabelecidos estes meios, foram identificadas suas respectivas fontes de Carbono e substituídas por uma solução de açúcar proveniente da hidrólise da farinha de macaxeira.

Para a hidrólise foi preparada uma solução aquosa da farinha peneirada. Esta solução foi tratada com 15 µL/g de α-amilase (Thermamyl®) por 30 minutos a 90° C. Após resfriamento, foi realizado um novo tratamento enzimático com 85 µL/g de glucoamilase AMG 300 (Novozymes®) por 60 minutos a 60° C. A solução hidrolisada foi centrifugada sob refrigeração a 4000 rpm por 15 minutos. A concentração da solução de açúcar proveniente do sobrenadante da hidrólise foi determinada pelo método enzimático Glicose Oxidase (GOD) segundo protocolo do fabricante (Human do Brasil®).

Para cada meio de cultura, em substituição à fonte de carbono, foram testadas três concentrações de açúcar proveniente da hidrólise (5, 10 e 15 g/L). A composição final de cada meio está descrita na Tabela 9.

Os meios foram cultivados sob agitação de 160 rpm, a 28° C durante 24 h. O crescimento foi determinado pela massa seca.

Alíquotas de 5 mL dos cultivos foram filtradas à vácuo em membranas *Millipore*®, de acetato de celulose com 44 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade previamente pesadas. O material foi submetido a uma lavagem com 10 mL de água destilada. A seguir, a membrana com o resíduo foi colocada em estufa de secagem a 80°C até estabilização da massa. A produção da biomassa (o peso seco) foi determinada pela diferença das massas da membrana com bactéria e da membrana sem bactéria, descontando-se a massa do meio (MONERRAT et al., 2008; LITAIFF, 2006).

A partir da solução bacteriana produzida pela fermentação do Teste III foi realizado um bioensaio seletivo, de acordo com o protocolo já descrito no item 3.3.2.1, para constatação da permanência da atividade larvicida do isolado BtAm 27, crescida em meios de cultura alternativos, constantes da Tabela 9.



Tabela 9: Componentes e respectivas concentrações (g/L) dos meios de cultura para crescimento do isolado BtAm 27 utilizando o hidrolisado da farinha de macaxeira (Teste III)

Origem	Meio de Cultura	G	H	Y.E.	P	C.N.	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>
LOPES; ARANTES; CENCI (2010)	1*	8,00	-	4,00	-	-	0,10	-	0,10	0,03	0,04	0,10	-	-	-
	2**	-	5,00	4,00	-	-	0,10	-	0,10	0,03	0,04	0,10	-	-	-
	3**	-	10,00	4,00	-	-	0,10	-	0,10	0,03	0,04	0,10	-	-	-
	4**	-	15,00	4,00	-	-	0,10	-	0,10	0,03	0,04	0,10	-	-	-
SOCCOL et al. (2009)	5*	10,00	-	3,50	5,00	-	10,00	5,00	-	-	-	-	-	-	-
	6**	-	5,00	3,50	5,00	-	10,00	5,00	-	-	-	-	-	-	-
	7**	-	10,00	3,50	5,00	-	10,00	5,00	-	-	-	-	-	-	-
	8**	-	15,00	3,50	5,00	-	10,00	5,00	-	-	-	-	-	-	-
Caldo Nutritivo Modificado	9*	-	-	1,00	-	13,00	1,00	-	-	0,01	-	-	0,10	0,01	0,01
	10**	-	5,00	2,50	-	-	1,00	-	-	0,01	-	-	0,10	0,01	0,01
	11**	-	10,00	2,50	-	-	1,00	-	-	0,01	-	-	0,10	0,01	0,01
	12**	-	15,00	2,50	-	-	1,00	-	-	0,01	-	-	0,10	0,01	0,01

Legenda: (\*) Composição Original; (\*\*) Composição Modificada; (-) Componente ausente; Componentes: G- Glicose; H- Solução de açúcar da hidrólise; Y.E.- Extrato de Levedura; P- Peptona; C.N.- Caldo Nutriente; S<sub>1</sub>- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; S<sub>2</sub>- NaCl; S<sub>3</sub>- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; S<sub>4</sub>- MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O; S<sub>5</sub>- CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; S<sub>6</sub>- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; S<sub>7</sub>- CaCO<sub>3</sub>; S<sub>8</sub>- FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; S<sub>9</sub>- ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*

Os isolados de *B. thuringiensis* estavam estocados no Laboratório de Tecnologia do DNA, do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM/UFAM), e armazenados em meio LB *soft* e foram transferidos para o Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Segundo SOUZA FILHO (2005) dez dos isolados presentes na coleção da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) foram positivos para amplificação com os primers *UnCry4*, e apresentaram toxicidade em larvas de Diptera, a saber: BtAM-05, BtAM-06, BtAM-18, BtAM-27, BtAM-28, BtAM-35, BtAM-49, BtAM-134, BtAM-135 e BtAM-165.

Todas as amostras mantiveram suas características morfológicas macroscópicas (cor, forma e borda da colônia).

Foi observada a presença de células esporulantes, em forma de bastão, Gram-positivas e cristais paraesporais em todos os isolados analisados.

### 4.2. VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

A Tabela 10a apresenta os resultados obtidos com os bioensaios seletivos dos dez isolados procedentes da coleção da UFAM. Estes isolados de *B. thuringiensis* foram mantidos em cultura de Caldo Nutritivo e os bioensaios seletivos foram preparados na concentração de 1 mL da cultura bacteriana em 10 ml de água destilada. Conforme observa-se na Tabela 10a, apenas cinco mostraram atividade larvicida simultaneamente para *A. aegypti* e *Anopheles* spp.

Dentre os isolados que apresentaram atividade larvicida – BtAm 06, BtAm 27, BtAm 28, BtAm 35 e BtAm 49, ressalta-se o BtAm 27 pois começa atuar na paralização das larvas após alguns minutos de contato as mesmas.

Os resultados para o bioensaio de dose deste trabalho para o isolado BtAm 27 estão apresentados na Tabela 10b e revelam mortalidade de 100% das larvas até a

concentração de  $1.10^{-2}$  reduzindo para 50% de mortalidade na diluição seguinte ( $1.10^{-3}$ ) nas primeiras 24 h. Ao final das 72h observou-se 69,0, 13,5 e 4,5% de mortalidade para as diluições  $1.10^{-3}$ ,  $1.10^{-4}$  e  $1.10^{-5}$ , respectivamente.

Tabela 10a: Percentual de mortalidade no Teste Seletivo dos isolados de *Bacillus thuringiensis* em larvas de *A. aegypti* e *Anopheles* spp.

Isolado	Atividade Tóxica - Leituras					
	<i>A. aegypti</i>			<i>Anopheles</i> spp.		
	24 h	48 h	Controle	24 h	48 h	Controle
BtAm 05	0	0	0	NA	NA	NA
BtAm 06	100	-	0	100	-	0
BtAm 18	0	0	0	NA	NA	NA
BtAm 27	100	-	0	100	-	0
BtAm 28	100	-	0	100	-	0
BtAm 35	100	-	0	100	-	0
BtAm 49	100	-	0	100	-	0
BtAm 134	0	0	0	NA	NA	NA
BtAm 135	0	0	0	NA	NA	NA
BtAm 165	0	0	0	NA	NA	NA

Legenda: (-) 100% de mortalidade na leitura anterior; NA – Não Avaliado.  
Total de larvas testadas: *A. aegypti* – 400; *Anopheles* spp. – 200.

O valor da  $CL_{50}$  observada para o isolado BtAm 27 foi 0,00052 DCT (0,00024 – 0,00093), crescida em meio caldo nutritivo. A reta de regressão linear está representada na Figura 13 e obedece a distribuição dada pela fórmula  $y = 11,19 + 1,88x$ , onde “x” equivale ao Log da Dose.

Tabela 10b: Percentual de Mortalidade de *A. aegypti* em Bioensaio de Dose

Diluição	n	Leitura			Total	Controle
		24h	48h	72h		
1.10 <sup>-1</sup>	200	100	-	-	100	0,0
1.10 <sup>-2</sup>	200	100	-	-	100	0,5
1.10 <sup>-3</sup>	200	50,0	15,0	4,0	69,0	1,5
1.10 <sup>-4</sup>	200	8,0	4,0	1,5	13,5	0,0
1.10 <sup>-5</sup>	200	3,5	1,0	0,0	4,5	0,5

Legenda: (-) 100% de mortalidade na leitura anterior; n- número de larvas testadas.

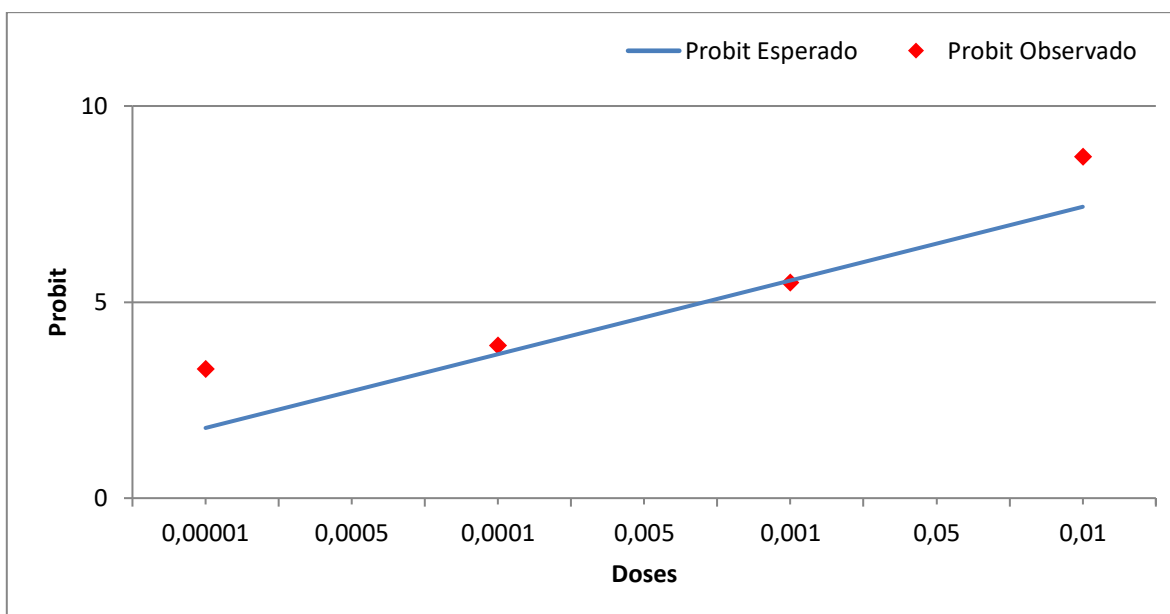


Figura 13: Retas de regressão linear dose-probit obtida nos bioensaios com isolado BtAm 27.

### 4.3. CRESCIMENTO BACTERIANO

O crescimento bacteriano foi acompanhado durante 17h, para determinação do período da fase *log* do desenvolvimento celular. Esta informação é essencial para o estabelecimento do tempo de cultivo do inóculo nos testes de fermentação.

A Figura 14 apresenta o gráfico dos resultados obtidos da contagem de células em Câmara de Neubauer, revelando o curto período de adaptação do BtAm 27 ao meio. Entrando rapidamente na fase exponencial do crescimento e estendendo-se até aproximadamente 13h de cultivo. Em seguida observa-se o declínio do número de células e posterior fase estacionária.

O tempo para o cultivo do inóculo foi estabelecido em 8h devido à intensa atividade celular neste período do crescimento.

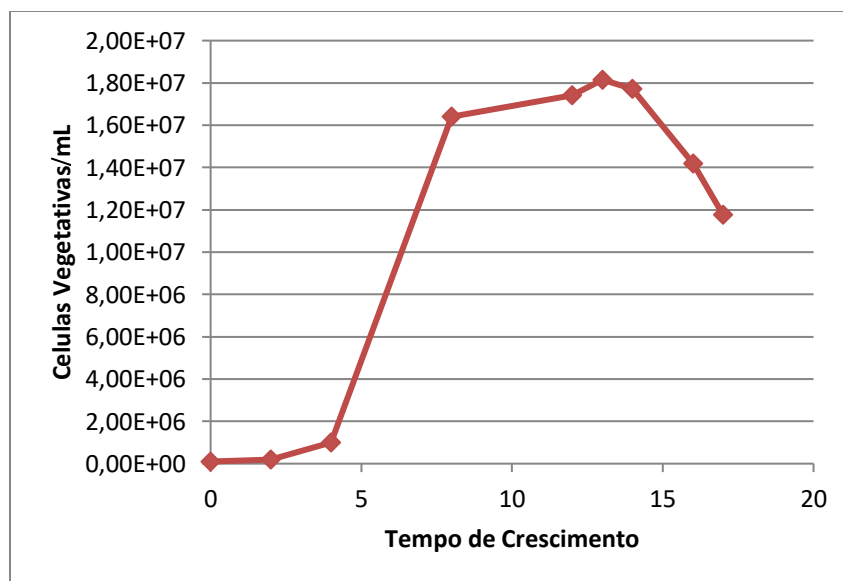


Figura 14: Curva de crescimento celular em meio Caldo Nutritivo (28° C, 160 rpm)

#### 4.4. CRESCIMENTO EM AMIDO

O crescimento do BtAm 27 em amido corado por vapor de Iodo, revelou a capacidade desta bactéria em metabolizar este substrato como fonte de carbono. Foi observada a formação de um halo reduzido em torno da colônia (Figura 15).

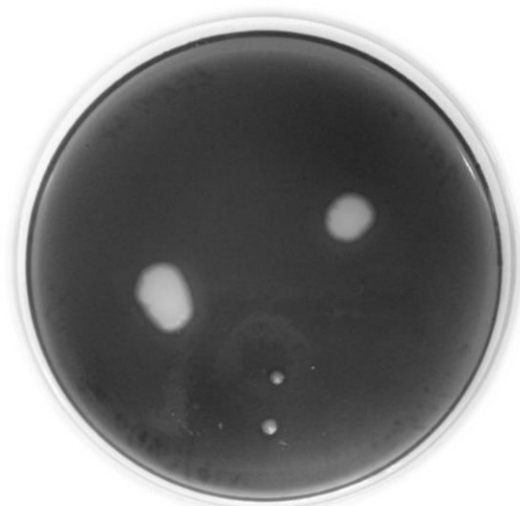


Figura 15: Crescimento do BtAm 27 em amido 1%.

#### 4.5. TESTES DE FERMENTAÇÃO

##### Teste I

A verificação do crescimento bacteriano para o Teste I foi feita por D.O. (Densidade Óptica) e está relacionada na Tabela 11.

A análise revelou o crescimento *Bacillus thuringiensis* abaixo do padrão para todas as combinações de meios testados. O Gráfico de Pareto (Figura 16) indicou concentrações inibitórias (efeito negativo) para a Farinha e o Extrato de Levedura.

A significância da uréia ficou abaixo da linha do *P-Value* de 95%, por não apresentar efeito significativo e foi excluída no Teste II.

O fosfato de potássio monobásico ( $K_2HPO_4$ ) apresentou significância maior que 95% e foi mantido nos experimentos. Ampliou-se sua faixa de teste para baixo chegando a ser testado em concentrações nulas, logo sendo suprimido de alguns meios preparados.

O Gráfico de Superfície de Resposta (Figura 17) apontou que o crescimento ótimo do bacilo tende para concentrações menores de farinha e maiores de extrato de levedura, que as adotadas no Teste I, permitindo a elaboração de uma nova série de experimentos.

Tabela 11: Leituras de D.O. para cada experimento do Teste I.

<i>Meio de Cultura</i>	<i>D.O.</i>	<i>Meio de Cultura</i>	<i>D.O.</i>
1	0,218	11	0,470
2	0,119	12	0,132
3	0,489	13	0,224
4	0,316	14	0,155
5	0,091	15	0,351
6	0,139	16	0,152
7	0,415	17	0,269
8	0,181	18	0,239
9	0,359	19	0,264
10	0,241	Controle (C.N.M.)	1,320

Legenda: D.O. – Densidade Óptica; C.N.M. – Caldo Nutritivo Modificado com adição de sais

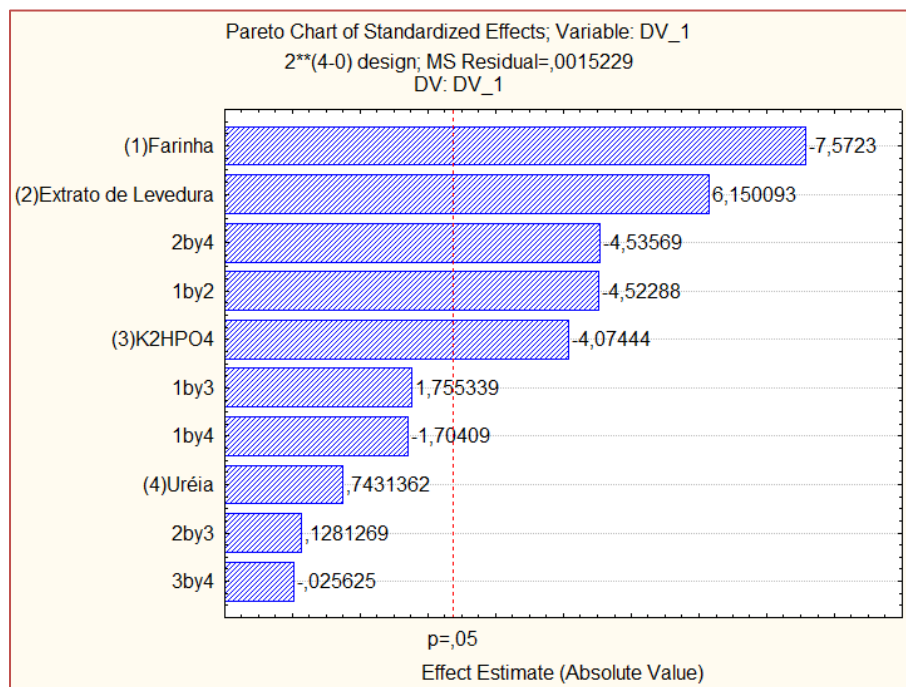


Figura 16: Gráfico de Pareto para crescimento do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>4</sup>.

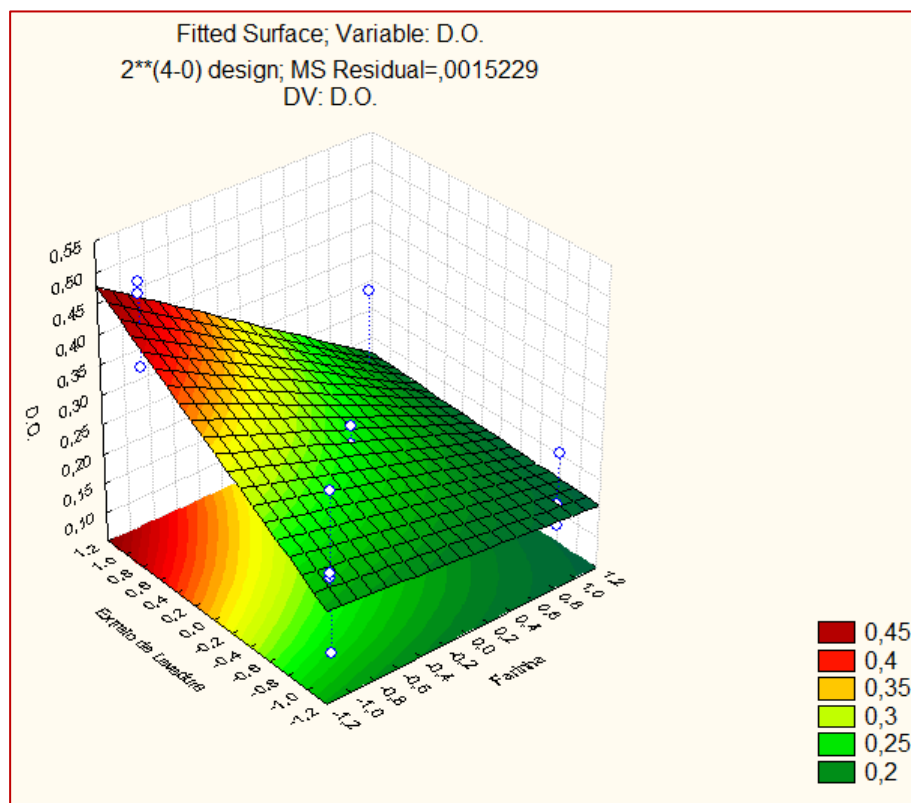


Figura 17: Gráfico de Superfície de Resposta para o Crescimento celular obtido no Teste I, relacionando valores codificados da Farinha e Extrato de Levedura.

## Teste II

Uma matriz DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) foi montada visando à melhoria do crescimento bacteriano. Novas concentrações para os componentes dos meios foram estabelecidas e dois pontos axiais adotados para cada concentração.

A análise do Gráfico de Pareto (Figura 18) gerado a partir do crescimento bacteriano da matriz DCCR revela uma significância maior que 95% ( $P < 0,05$ ) para todos os componentes do meio. O extrato de levedura e o  $K_2HPO_4$  mostraram-se importantes para o crescimento bacteriano. A farinha apresentou a maior significância do meio de cultura, pois supre as necessidades energéticas do organismo.

Dos meios de cultura avaliados no Teste II, os maiores crescimentos foram verificados nos que receberam números 1 (D.O.=0,846), 5 (D.O.=0,869) e 9 (D.O.= 0,897). No entanto, mantiveram-se abaixo do crescimento alcançado com o meio de cultura Caldo Nutritivo modificado com adição de sais, utilizado como controle no Teste II. Comparando



o crescimento obtido com os meios de cultura numerados por 1, 5 e 9 e o crescimento no com o meio de cultura Caldo Nutritivo modificado com adição de sais, verificou-se 54,65, 56,14 e 57,94 %, respectivamente, de equivalência ao crescimento do meio de cultura padrão (Tabela 12).

Os gráficos de superfície de resposta (Figura 19 e 20) apontam que o crescimento ótimo do microrganismo tende para concentrações codificadas menores, tanto de farinha quanto de  $K_2HPO_4$  e maiores de extrato de levedura.

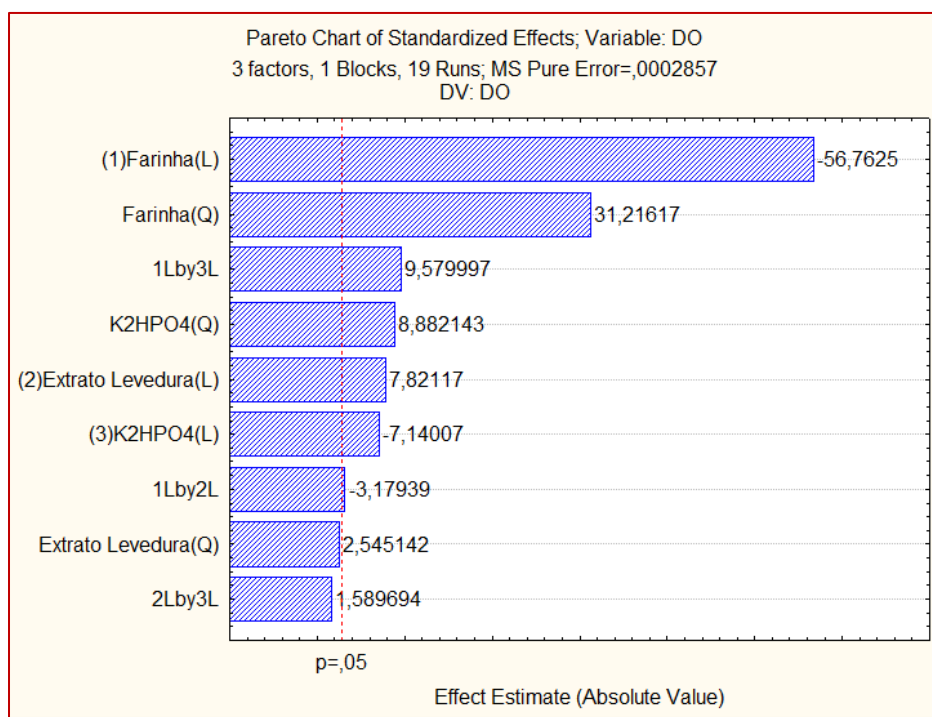


Figura 18: Gráfico de Pareto para crescimento da Matriz DCCR.

Tabela 12: Leituras de D.O. para cada experimento do Teste II.

<i>Meio de Cultura</i>	<i>O.D.</i>	<i>Meio de Cultura</i>	<i>O.D.</i>
1	0,846	11	0,312
2	0,103	12	0,224
3	0,572	13	0,124
4	0,190	14	0,248
5	0,869	15	0,221
6	0,182	16	0,198
7	0,765	17	0,227
8	0,175	18	0,240
9	0,897	19	0,238
10	0,217	Controle (C.N.M.)	1,548

Legenda: D.O. – Densidade Óptica; C.N.M. – Caldo Nutritivo Modificado com adição de sais

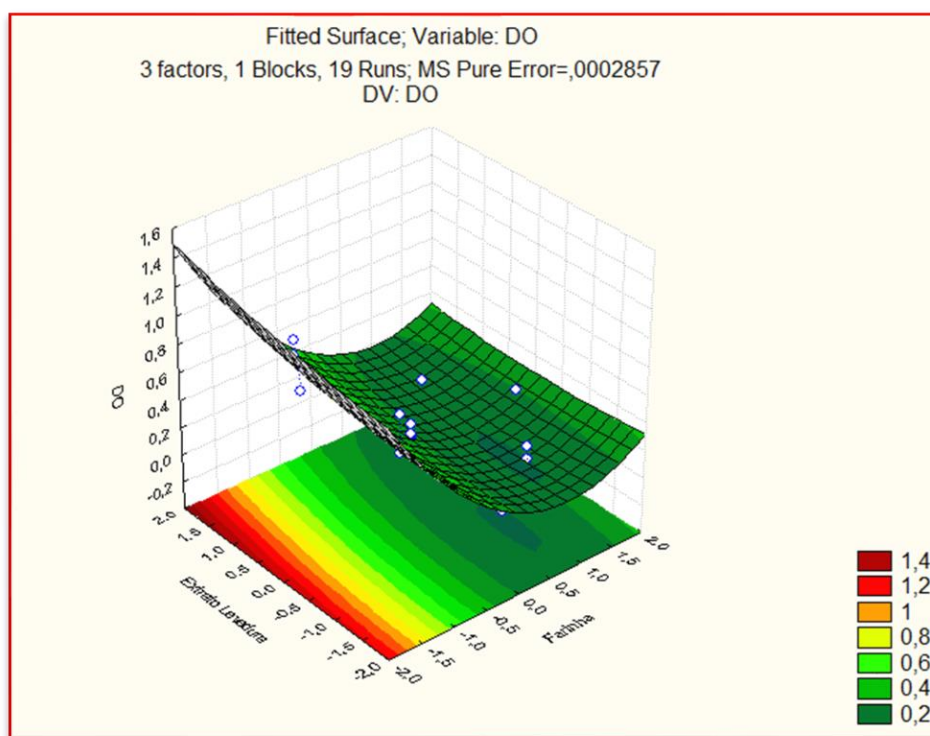


Figura 19: Gráfico de Superfície de Resposta para o Crescimento celular obtido no Teste II, relacionando valores codificados para farinha e extrato de levedura.

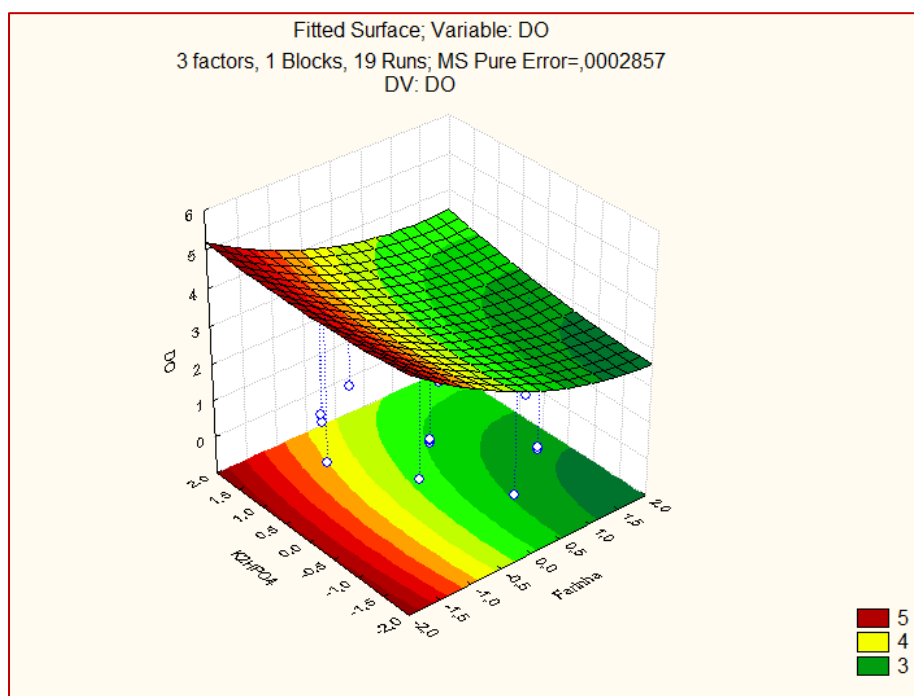


Figura 20: Gráfico de Superfície de Resposta para o Crescimento celular obtido no Teste II, relacionando valores codificados para farinha e  $K_2HPO_4$ .

### Teste III

Os resultados obtidos com o crescimento nos Testes I e II mostraram valores inferiores ao controle, indicando uma provável incapacidade metabólica de aproveitamento do amido contido na farinha de macaxeira. Desta forma, optou-se pela hidrólise enzimática desse substrato como alternativa para favorecer o crescimento bacteriano.

Com a introdução da hidrólise obteve-se uma solução com 163,42 g/L de glicose, utilizada como componente dos meios de cultura em substituição a fonte de carbono utilizada por LOPES; ARANTES; CENCI (2010), SOCCOL et al. (2009) e Caldo Nutritivo, estabelecido como meio padrão para crescimento do *B. thuringiensis*.

No Teste III o crescimento foi quantificado por massa seca. Essa determinação não foi possível nos testes anteriores devido à utilização da própria farinha de macaxeira como componente dos meios. Apesar de ter sido reduzida a uma fécula pela peneiração, percebia-se a sua permanência em suspensão nos meios de cultura. Desta maneira, a filtração seria inviável, pois impediria a passagem de volumes ideais para a quantificação confiável do

crescimento. Sendo assim, a determinação do crescimento bacteriano por espectrofotometria mostrou-se mais adequada, e utilizou-se próprio meio puro como controle em cada uma das determinações.

A disponibilidade da glicose simples melhorou o crescimento do *B. thuringiensis*. Observando-se a Tabela 13 verifica-se que o meio de cultura 4 apresentou massa seca (produtividade) 8 vezes maior que a verificada no meio de cultura caldo nutritivo, tomado como controle (meio de cultura 9).

Os testes foram estabelecidos de forma a se elevar gradativamente a concentração de glicose para cada experimento. Desta forma, para cada um dos três tipos de meios testados - LOPES; ARANTES; CENCI (2010), SOCCOL et al. (2009) e Caldo Nutritivo, foram substituídas quantidades crescentes da glicose proveniente da hidrólise. Desta maneira, como mostra a Tabela 9, os meios 2, 6 e 10 continham o equivalente 5 g/L de glicose; os meios 3, 7 e 11 o equivalente a 10 g/L e os meios 4, 8 e 12 o equivalente a 15 g/L.

Assim, observa-se que juntamente com a elevação da concentração da glicose há aumento da produtividade de massa seca, o que permite constatar que o crescimento do *B. thuringiensis* foi diretamente proporcional à oferta de glicose. Na Figura 21, esses meios estão ressaltados por cores diferentes – 2, 6 e 10: menor concentração de glicose (vermelho); 3, 7 e 11 concentração média de glicose (verde); e 4, 8 e 12 maior concentração de glicose (azul).

Em relação às medidas de Densidade Óptica, verificou-se que no meio controle do Teste III o valor foi de 1,71, enquanto que no meio de cultura 4, que mostrou a maior produtividade, a D.O. foi de 8,55, indicando também melhoria do crescimento bacteriano, corroborando com os dados obtidos com a avaliação da massa seca.

As maiores produtividades foram observadas nos meios derivados de LOPES; ARANTES; CENCI (2010) que se apresenta como um meio simples, sem peptona e  $K_2HPO_4$ . No entanto, apresenta outros sais que não estão presentes nos demais meios (Tabela 9).

Tabela 13: Crescimento avaliado pela massa seca, para os meios de cultura com o hidrolisado da farinha de macaxeira (Teste III).

<i>Meio de Cultura</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Meio de Cultura</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>	<i>Meio de Cultura</i>	<i>Massa Seca (g/L)</i>
1*	2,9	5*	2,6	9*	0,6
2**	1,8	6**	1,8	10**	1,4
3**	4	7**	2,8	11**	2,2
4**	4,8	8**	3	12**	2,4

Legenda: (\*) Composição Original; (\*\*) Composição Modificada (conforme tabela 9); Meios de Cultura: 1 a 4 - LOPES, ARANTES; CENCI (2010); 5 a 8 - SOCOOL et al. (2009); 9 a 12 - Caldo Nutritivo Modificado.

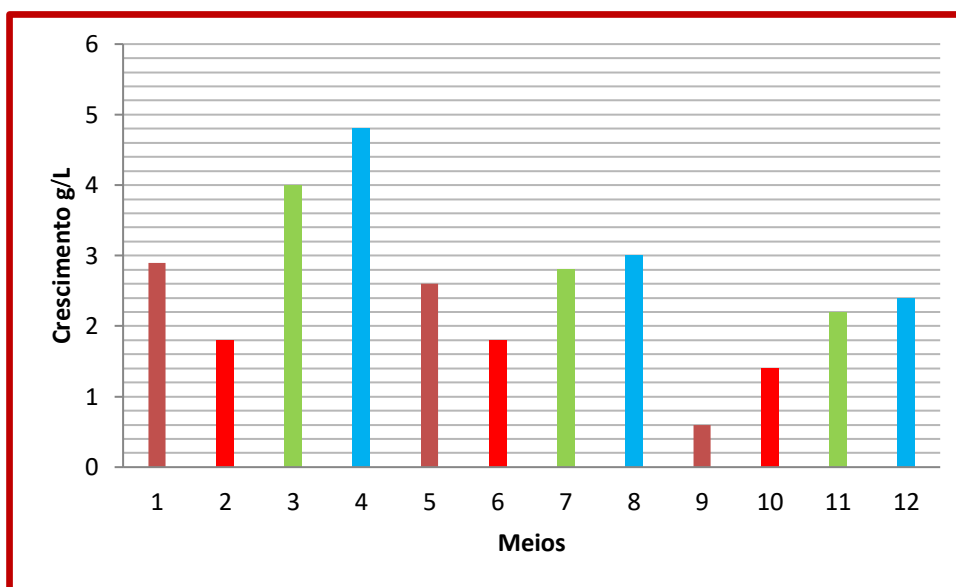


Figura 21: Gráfico da produtividade (massa seca) utilizando-se os meios de cultura com hidrolisado de farinha de macaxeira (Teste III).

Legenda: Concentração de glicose: meios 2, 6 e 10 – 5g/L (vermelho); meios 3, 7 e 11 – 10g/L (verde); e meios 4, 8 e 12 – 10g/L (azul).

#### **4.6. ATIVIDADE LARVICIDA DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO**

Os bioensaios seletivos de toxicidade, realizados com os fermentados produzidos no Teste III, demonstraram a permanência da atividade tóxica da bactéria crescida em todas as condições nutricionais. Foi verificado 100% de mortalidade nas primeiras 24 h de observação, tanto para as larvas de *A. aegypti* quanto para *Anopheles* spp., em todos os meios produzidos (Tabela 14).

Essa análise prévia não é capaz de revelar o nível de eficiência larvicida do isolado frente aos suprimentos nutricionais testados, no entanto demonstra que as condições mínimas para esporulação bacteriana e produção da toxina foram alcançadas pela estirpe fermentada. Esse indício revela a potencialidade do isolado para ser usado como agente de um bioinseticida eficiente contra vetores da Malária e da Dengue.

Ensaio quantitativos mais detalhados são necessários para se avaliar o grau de letalidade da bactéria crescida nos meios em questão.

Tabela 14: Percentual de mortalidade de *A. aegypti* e *Anopheles* spp. em bioensaio seletivo com meios de cultura preparados com hidrolisado da farinha de macaxeira (Teste III).

Meio de Cultura	Atividade							
	<i>A. aegypti</i>				<i>Anopheles</i> spp.			
	n	24h	48h	Controle	n	24h	48h	Controle
1*	40	100	-	0	40	100	-	0
2**	40	100	-	0	40	100	-	0
3**	40	100	-	0	40	100	-	0
4**	40	100	-	0	40	100	-	0
5*	40	100	-	0	40	100	-	0
6**	40	100	-	0	40	100	-	0
7**	40	100	-	0	40	100	-	0
8**	40	100	-	0	40	100	-	0
9*	40	100	-	0	40	100	-	0
10**	40	100	-	0	40	100	-	0
11**	40	100	-	0	40	100	-	0
12**	40	100	-	0	40	100	-	0

Legenda: (\*) Composição Original; (\*\*) Composição Modificada (conforme Tabela 9); (-) 100% de mortalidade na leitura anterior; Meios de Cultura: 1 a 4 - LOPES, ARANTES; CENCI (2010); 5 a 8 - SOCOOL et al. (2009); 9 a 12 - Caldo Nutritivo.

## 5. DISCUSSÃO

O controle biológico, com a utilização de bactérias entomopatogênicas, tem se mostrado como um método alternativo promissor para o controle de vetores de doenças de impacto social. A resistência dos insetos aos produtos químicos vem favorecendo a pesquisa e o desenvolvimento do controle biológico. Permitindo a consolidação desta técnica como indispensável para o bem das comunidades do campo e das cidades (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003; FERNÁNDEZ-LUNA et al., 2010).

Neste sentido, destaca-se o uso do *B. thuringiensis*. Sua descoberta em 1901 marcou o início de sua exploração como agente de biolarvicidas, permitindo uma nova perspectiva no controle de larvas de mosquitos que já apresentavam resistência aos inseticidas químicos (HABIB, 1989).

Desde então inúmeras pesquisas foram realizadas, muitos isolados foram testados e vários produtos desenvolvidos. No entanto a busca incessante por novas formulações é indispensável devido a possibilidade de resistência dos insetos aos produtos já existentes (DIAS et al. 2002).

O maior entrave para a utilização dos biolarvicidas é o custo, neste sentido a busca por meios de cultivo alternativos, com custos reduzidos tem sido a principal vertente de pesquisas de muitos grupos (SOCCOL et al. 2009).

### 5.1. CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS

As colônias crescidas em placa de Petri apresentaram-se sem pigmentação, opacas, com bordas onduladas e estrutura densa, semelhantes às descritas por POLANCZYK; SILVA; FIUZA (2004). Em microscópio óptico visualizou-se células Gram-positivas, esporulantes e com formações paraesporais. Segundo JUNG et al. (1998) observação destas características microscópicas são indícios de isolados de Bt. No entanto, estas propriedades não são suficientes para estabelecer uma amostra como sendo desta espécie (PORCAR & JUAREZ-PEREZ, 2003).

ABREU, THULER; LEMOS (2008) discutem a similaridade morfológica entre as espécies do gênero *Bacillus*, indicando os métodos moleculares para a identificação e



caracterização do *B. thuringiensis*. O uso de técnicas moleculares vem mostrando eficiência na identificação de estirpes com atividade inseticida (FATORETTO et al., 2007). Os isolados utilizados neste trabalho já haviam sido caracterizados por SOUZA FILHO (2005) e SILVA (2011).

## 5.2. ATIVIDADE BIOLARVICIDA

A atividade larvicida dos isolados de *B. thuringiensis* é predominantemente pesquisada nas coleções desta bactéria. Sua ação baseia-se na presença de inclusões cristalinas formadas durante a sua esporulação. Esses cristais proteicos são formados a partir de genes cromossômicos e, principalmente, plasmidiais controlados por condições metabólicas estabelecidas pelas concentrações nutricionais do meio (PINTO et al. 2009/2010).

A troca e a perda de plasmídios entre as linhagens de *B. thuringiensis* ocorre com certa frequência e deve ser evitada com estocagem e manutenção adequada (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). Essa possibilidade implicaria na perda de sua atividade tóxica, como aconteceu com alguns dos isolados testados. No entanto, nestes casos, BIZZARI et al. (2008) indica que a passagem da bactéria pelo inseto, seguido de um novo isolamento pode reativar a sua toxicidade.

As amostras isoladas por SOUZA FILHO (2005) cresceram em meio seletivo com Penicilina, no entanto não se manteve a pressão seletiva na manutenção do estoque. Resistência a antibióticos em bactérias geralmente está associada à presença de plasmídeos, neste caso junto com as sequências codificadoras das proteínas do cristal. Segundo POLANCZYK & ALVES (2003) bactérias tendem a perder plasmídeos na ausência de seletividade, este indício aliado a não refrigeração dos estoques pode explicar a perda de atividade em algumas amostras.

Muitos trabalhos têm demonstrado a atividade do *B. thuringiensis* sobre larvas de diversos insetos: *Spodoptera frugiperda* (CAPALBO et al. 2001; RIBAS et al., 2008a; RIBAS et al., 2008b), *Plutella xylostella* (MEDEIROS et al. 2005), *A. aegypti* (ESPINDOLA; GUEDES; DE SOUZA, 2008) *Chilo suppressalis* (FIUZA et al. 1996), *Anopheles albimanus* (FERNÁNDEZ-LUNA et al. 2010), *Anopheles* spp. (TADEI, 2001;

TADEI & RODRIGUES, 2002) *Culex quinquefasciatus* (GUNASEKARAM; PRABAKARAM; BALARAMAM, 2002), *Helicoverpa armigera* (BAGCHI, 2000), *Spodoptera eridania* e *Spodoptera cosmioides* (SANTOS et al. 2008). A sua ação sobre larvas de Lepdopteras, Coleopteras e Dipteras é explorada a mais de um século, e a cada ano são identificadas novas linhagens produtoras de proteínas ainda não estudadas (PRAÇA et al. 2004; POLANCZYK, 2004; CRICKMORE et al. 2012).

Dentre os isolados utilizados neste trabalho, ressalta-se o BtAm 27 que mostrou a característica de atuar na paralização das larvas logo após alguns minutos de contato. Esta propriedade deste isolado, relatada inicialmente por SOUZA FILHO (2005) e confirmada por SILVA (2011) é o indicador do seu potencial para produção de um bioinseticida. Neste sentido, os dados deste trabalho, relativos à toxicidade do isolados BtAm 27 ativo contra larvas de *A. aegypti* e *Anopheles* spp. (Tabela 10a e 10b) corroboram para aumentar a variedade de *Bacillus* entomopatogênicos ativos para o controle de Diptera (ARIETA & ESPINOZA, 2006; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O alto índice de mortalidade nas primeiras 24h de exposição das larvas de *A. aegypti* ao BtAm 27 já havia sido verificado por SILVA (2011), quando a amostra apresentou mortalidade de 100% nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  do teste nas primeiras 24 h. Nos experimentos atuais verificou-se apenas 50% de letalidade na última concentração, isso pode ser um indício da perda de eficiência deste isolado ou diferença de meios utilizados para o crescimento do isolado. Segundo VALICENT et al. (2005) e CAPALBO (1982) a diferença de composição do meio, assim como as condições operacionais de produção, implicam em diferença de letalidade devido as condições metabólicas próprias da bactéria.

LACEY (2007) indica diversos fatores bióticos e abióticos capazes de interferir na atividade larvicida do Bt, entre eles ressalta-se, o meio no qual a bactéria é cultivada, as condições de armazenamento, além da taxa de ingestão da toxina pela larva, classificado por LOPES, ARANTES; CENCI (2010) como sendo o grau de alimentação larval.

No entanto, o primeiro fator levado em consideração para a introdução do *B. thuringiensis israelensis* como alternativa viável no controle de mosquitos é a sua alta eficiência contra várias espécies causando uma mortalidade significativa nas primeiras 24 h após a aplicação (REGIS; SILVA; MELO-SANTOS, 2000). Outro aspecto mencionado por

LOPES; ARANTES; CENCI (2010) é a utilização de processos de concentração como filtragem ou centrifugação, no aumento da toxicidade de fermentados de *Bacillus*.

Comparando-se o valor da  $CL_{50} = 0,00052$  DCT (0,00024 – 0,00093) encontrada neste trabalho para o BtAm 27, percebe-se um aumento do valor da dose em relação aos resultados encontrados por SILVA (2011), no entanto não desqualificam o isolado para o uso como larvicida biológico.

POOPATHI & ARCHANA (2012) evidencia a diferença do meio como sendo capaz de alterar a grau de toxicidade das estirpes de *B. thuringiensis*. Estes dados evidenciam que um meio de cultura adequado pode potencializar a atividade larvicida da linhagem deste trabalho - BtAm 27, enquadrando a estirpe como promissora para ser usada como agente de um biolarvicida para *A. aegypti* e *Anopheles* spp., já que mostrou-se ativa para larvas de ambos os insetos.

### 5.3. TESTES DE CRESCIMENTO EM AMIDO

PELIZER; PONTIERI; MORAES (2007) indica a utilização de resíduos amiláceos como substrato viável para o crescimento de bactérias entomopatogênicas. Para os autores, esses resíduos quando liberados no ambiente permitem a proliferação dos mais variados microrganismos. Portanto, a utilização de resíduos amiláceos como fonte nutrientes para o crescimento de microrganismos, favorece a redução da poluição ambiental, minimizando os impactos sobre a natureza.

LIU & TZENG (1998) utilizaram tapioca como única fonte de Carbono para o crescimento de *B. thuringiensis*. Eles confirmaram a capacidade da bactéria metabolizar, de forma significativa, o amido presente neste substrato, resultando em uma evidente produção de esporo. Desta maneira percebe-se a possibilidade da utilização de fontes amiláceas para a produção de bioinseticidas.

O crescimento do isolado BtAm 27 em amido, revelou uma discreta formação de halo em volta das colônias indicando uma pequena produção de amilase.

## 5.4. ENSAIOS FERMENTATIVOS

A busca por meios de cultura ideais para o cultivo de *B. thuringiensis* é almejada desde as primeiras tentativas de cultivo desta bactéria. Segundo MAEDOWS; ELLIS; JARRETT (1996), alta produtividade de biomassa, reduzido custo e a esporulação prévia são características ideais para o estabelecimento de um meio de cultura viável para produção de *B. thuringiensis*.

O primeiro produto a base de Bt foi comercializado em 1938 (DIAS, 1992), desde então vem-se buscando meios apropriados para produção de bioinseticidas. Neste sentido trabalhos que visem à melhoria da produtividade e a diminuição do custo de produção são necessários para o desenvolvimento de plantas nacionais de produção.

Os testes fermentativos foram desenvolvidos no intuito de verificar a possibilidade e a eficiência de crescimento da bactéria em meios a base de amido e glicose.

### 5.4.1. TESTES COM FARINHA DE MACAXEIRA

Uma simples visita aos mercados e feiras de Manaus revela o desperdício diário de uma serie de resíduos, entre estes a macaxeira mostra-se constantemente presente. Como substrato a *Manihot utilissima* Pohl, pode ser perfeitamente aproveitada como fonte de carbono para o cultivo de diversos microrganismos de potencial biotecnológico. Na tentativa do estabelecimento de um mecanismo de aproveitamento para este resíduo, utilizou-se neste trabalho a farinha, um produto primário da macaxeira, para crescimento de *B. thuringiensis*. Segundo informações verificadas no rótulo de várias empacotadoras do produto, a farinha mantém altos índices de amido, proteínas e outros minerais encontrados na macaxeira *in natura*.

Entretanto, as formulações com farinha de macaxeira peneirada mostraram-se inviáveis para produção de biomassa utilizando-se o *B. thuringiensis*. O crescimento em todos os meios testados foram inferiores ao do controle. Estes resultados são contrários aos encontrados por LIU & TZENG (1998), ao utilizarem tapioca, farinha de peixe e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), alcançaram valores na ordem de  $10^8$  esporos/mL. Tal crescimento está

acima do encontrado nos Testes I e II, pois ao se verificar a curva de crescimento da bactéria em meio padrão, seu ponto máximo foi verificado por volta de 13 h de cultivo, quando alcança  $10^7$  células vegetativas/mL. Ao considerar-se a produção de um esporo por cada célula vegetativa percebe-se um crescimento inferior ao do trabalho citado.

LIU E TZENG (1998) confirmaram o efeito inibidor do cálcio para a esporulação e, ativador de amilases durante a fase vegetativa do crescimento. Logo a ausência de cálcio na composição dos meios testados pode ter impossibilitado a ativação de amilases indispensáveis para a metabolização do amido, inviabilizando a produtividade do meio. Segundo CAPALBO (1989) o cálcio juntamente com vários outros íons realmente afetam diretamente a esporulação de diversas bactérias.

As concentrações de farinha de macaxeira utilizadas no preparo dos meios de cultura não foram as ideais para o crescimento ótimo da bactéria, visto que a densidade óptica verificada nos meios de cultura testados foram inferiores a do meio Caldo Nutritivo modificado com adição de sais, utilizado como controle dos experimentos. Assim, percebe-se a necessidade de outros testes com concentrações diferentes das adotadas nas matrizes testadas. A busca de um meio de cultura apropriado para o crescimento do isolado testado, parte dos dados preliminares obtidos neste trabalho, e apontam a tendência nutricional do microrganismo.

#### **5.4.2. TESTES COM HIDROLISADO**

No Teste III, desenvolvido com meios contendo o produto da hidrólise da farinha, basicamente glicose, houveram crescimentos superiores ao verificado no meio de cultura controle. A disponibilidade do substrato na forma mais simples favoreceu acentuadamente o crescimento bacteriano.

A utilização da glicose como fonte de carbono para o crescimento de *B. thuringiensis* já foi testada desde 1968 por DUBOIS (1968), produzindo  $2 \times 10^9$  esporos viáveis por mililitro. Desde então inúmeras otimizações de meios para produção de *B. thuringiensis* vem sendo testadas (MORAES, 1973; GOLDBERG et al., 1980; CAPALBO, 1989; ALVES; ALVES; CAPALBO, 1997). Alguns testes bem sucedidos serviram de base para produção industrial de *B. thuringiensis* e transformaram-se em produto, como o Bt-

Horus<sup>®</sup>, produzido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF) (MONNERAT et al., 2008), utilizando sacarose como fonte de carbono na concentração de 40 g/L.

Neste trabalho a produção de biomassa foi proporcional a oferta de glicose, até a última concentração testada. Alcançando produtividade máxima de 4,8 g/L (O.D. = 8,55) no meio de cultura 4 do Teste III, onde foi utilizado 15 g/L do açúcar. Nos testes desenvolvidos por MORAES (1973) foi verificado um crescimento maior que o verificado neste trabalho. A autora constatou produtividade máxima (massa seca) quando disponibilizou 6 g/L de glicose, verificando-se sua diminuição para concentrações maiores e menores que esta.

Utilizando penas de aves trituradas e pó de pupa de insetos POOPATHI & ARCHANA (2012) produziram 4,78 e 5,20 g/L em meios sem e com suplementação de sais minerais, respectivamente.

POOPATHI (2010) cresceu *B. thuringiensis* em meio NYSM a base de glicose acrescido de farelo de arroz e obteve 3,5 de Densidade Óptica em 72 h de crescimento. Resultados diferentes haviam sido verificados por VALICENT et al. (2005), onde a adição de resíduos de arroz não aumentou a produção porém potencializou a toxicidade.

O meio preparado por LOPES; ARANTES; CENCI (2010) serviu para produção de uma formulação chamada BioUel. Esse formulado apresentou ITU (Unidade Tóxica Internacional) compatível com produtos comerciais citados na literatura. No entanto, em relação à produtividade não são mencionados resultados, provavelmente por este trabalho se tratar de testes prévios para uma preparação comercial de bioinseticida.

SOCCOL et al. (2009) estabelece uma relação de custos entre um meio proposto e outros três utilizados para o crescimento de *B. thuringiensis*, entre os quais está o utilizado no presente trabalho. Segundo os autores esse meio apresenta-se com custo elevado, porém de produtividade significativa. Nos trabalhos de SOCCOL et al. (2009), a avaliação da produtividade do meio em questão foi apenas teórica. Os autores consideraram a conversão total de carbono e nitrogênio do meio para estimar a produtividade em biomassa do *B. thuringiensis*. Os mesmos autores revelam a produtividade do meio proposto à base de melação de cana e proteína de soja na ordem de 19 g/L em biorreator de bancada, valor bem acima do encontrado nesse trabalho. No entanto, PEREIRA JUNIOR; BOM; FERRATA

(2008) indicam a utilização de biorreatores como eficiente para o aumento da produtividade de bioprocessos.

KESHAVARZI; SALIMI; MIRZANAMADI (2005) confirmaram a importância do controle do pH e da aeração para a boa produtividade de *B. thuringiensis*. Estes autores produziram  $1,7 \times 10^9$  esporos viáveis por mililitro, quando estabeleceram uma relação de 0,2 entre o volume nominal do frasco e o volume do meio a uma agitação de 200 rpm. Estas mesmas condições foram adotadas neste trabalho, alcançando-se produtividade máxima de 4,8 g/L de massa seca, quando utilizou-se 15 g/L da glicose proveniente da hidrólise da farinha.

A utilização de glicose, amido e melão de cana como fontes de Carbono para crescimento de *B. thuringiensis* é mencionada por ANGELO, VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ (2010) como sendo inibidores da produção da Proteína Cry, em especial a Cry4B. No entanto, POOPATHI (2010) encontrou resultados conflitantes a estes, pois potencializou a atividade larvicida da linhagem padrão de Bti (IPS-82) quando a cresceu em meio preparado com farelo de arroz que apresenta amido em sua composição.

POOPATHI & ARCHANA (2012) testaram vários meios de cultura com diferentes fontes de carbono, encontrando a melhor  $CL_{50}$  para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* em um meio com glicose. Logo é importante testes de crescimento em diferentes meios para a viabilização da produção x esporulação da bactéria, o que implica diretamente na sua toxicidade.

Outro aspecto importante revelado por MORAES (1973) é a particularidade de toxicidade de cada isolado frente ao meio de produção. VALICENT et al. (2005) testou várias concentrações de resíduo de arroz como suplemento para meios distintos, e encontrou toxicidade diferentes para cada uma.

O crescimento do BtAm 27 em meio com o hidrolisado da farinha não inativou a toxicidade da bactéria, causando a morte de larvas de *A. aegypti* e *Anopheles spp.*, conforme os dados das tabelas 10a e 10b. Esses dados estão de acordo com os trabalhos de VALICENT et al. (2005), com teste de isolados mantidos em resíduos de arroz e POOPATHI (2010) com a linhagem padrão de Bti mantida em farelo de arroz. Ainda cita-se o trabalho de POOPATHI & ARCHANA (2012) que cresceram a padrão em diferentes meios contendo penas de aves, pupas de mosquitos, casca de coco, entre outros. No

entanto, os dados deste trabalho não coincidem, em parte, com os dados descritos por ANGELO, VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ (2010) em sua revisão sobre as características gerais e fermentação de Bti. Dentre os pontos levantados pelos autores cita-se que a glicose, amido e melão inibem a produção de proteínas Cry com ênfase em Cry4B.

Outros testes mostram-se necessários para estabelecimento do pH ótimo para crescimento do BtAm 27. Assim como da possibilidade de utilização de outros resíduos de nossa ampla matriz produtiva, tais como banana (*Musa spp.*), pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e farinha de peixe (piracuí) como fonte alternativa de nitrogênio para crescimento do *B. thuringiensis*.

Tais iniciativas podem permitir a melhoria da produtividade e diminuição significativa do custo de produção.

CRICKMORE et al. (2012) informa a existência de mais de 200 holótipos diferentes do gene *cry*, cada um podendo formar uma proteína com toxicidade específica a diferentes larvas de insetos. Portanto o isolado selecionado neste trabalho necessita ser analisado do ponto de vista de sua variabilidade genética, com foco especialmente nos holótipos do gene *cry*, para sua caracterização quanto ao seu caráter tóxico frente a larvas de outros Dipteras.



## 6. CONCLUSÕES

- Dentre as combinações de composição de meios de cultura testados, contendo a farinha de macaxeira, o extrato de levedura e o fosfato monobásico de potássio, na concentração de 1,60 g/L - 1,5 g/L - 0,5 g/L, respectivamente, foi a composição que mostrou o melhor crescimento de *Bacillus thuringiensis*, alcançando o valor 0,897 de densidade óptica (D.O.).
- No entanto, o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, no meio de cultura padrão (caldo nutritivo modificado com adição de sais), foi superior ao verificado nos meios com diferentes concentrações da farinha de macaxeira, do extrato de levedura e do fosfato monobásico de potássio, atingindo 1,548 de densidade óptica.
- A hidrólise enzimática da farinha de macaxeira, com  $\alpha$ -amilase (15  $\mu$ L/g) e glucoamilase (85  $\mu$ L/g), mostrou-se uma alternativa para sua utilização como fonte de carbono para crescimento de *Bacillus thuringiensis*, proporcionando massa seca bacteriana de 4,8 g/L.
- A produtividade de *Bacillus thuringiensis* BtAm 27 foi diretamente proporcional à oferta de glicose proveniente da hidrólise enzimática da farinha de macaxeira.
- *Bacillus thuringiensis* BtAm 27 mostra-se promissor para utilização no controle biológico de larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles* spp., não perdendo a atividade larvicida quando cultivado em meio com glicose, proveniente da hidrólise enzimática da farinha de macaxeira.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABREU, I.L.; THULER, A.M.G.; LEMOS, M.V.F. Análise da diversidade genética de isolados de *Bacillus thuringiensis* por FAFLP, **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.41 - 47, 2008.
- ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª Ed., Piracicaba: FEALQ, 1163p, 1998.
- ANGELO, E.A.; VILAS-BÔAS, G.T. Castro-Gómez, R.J.H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, out./dez. 2010.
- ARRIETA, G.; ESPINOZA, A.M. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. **Rev. Biol. Trop.**, v. 54, n. 1, p. 13-27, 2006.
- ASSUMPÇÃO FILHO, U.G. & SILVA, W.C. Aplicación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SH-14 contra *Aedes* (S) *aegypti*. **Rev Cubana Med Trop.** v. 56, n. 3, p. 163-166, 2004.
- BACK, C.; BARBAZAN, P. Bacterial control in Africa using B.t.i and *B. sphaericus* against Simuliidae and Culicidae. **Proc VI Int Coll Invert Pathol Microb Control**, Montpellier, France, p. 254-258, 1994.
- BAGCHI T. Partial purification of Cry1A toxin-binding proteins from *Helicoverpa armigera* larval midgut. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 635-640, 2000.
- BATISTA JUNIOR, C.B.; ALBINO, U.B.; MARTINES, A.M.; SARIDAKIS, D.P.; MATSUMOTO, L.S.; AVANZI, M.A.; ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, 2002.
- BIZZARRI, M.F.; BISHOP, A.H.; DINSDALE, A; LOGAN, N.A. Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 60–69, 2008.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiol e Serviços de Saúde**, v. 16, p. 295-302, 2007.
- BRASIL. Casos confirmados de Malária, segundo mês de notificação em 2009. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2010b. <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab\\_casos\\_conf\\_malaria\\_seg\\_mes\\_not\\_bra\\_gr\\_e\\_ufs\\_09.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_conf_malaria_seg_mes_not_bra_gr_e_ufs_09.pdf)>. Acessado em 18 de Maio de 2011, 17:35:00.
- BRASIL. Dengue No Brasil: Situação Atual e Atividades de Controle e Prevenção. Boletim Eletrônico Epidemiológico, v. 02, n. 03, 8p, 2002.

BRASIL. Identificação de Áreas de Maior Vulnerabilidade para Ocorrência de Dengue no período de Transmissão 2010/2011 com vistas a subsidiar a intensificação das ações de controle. Nota Técnica N.º 118 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS, 12p, 2010a.

BRASIL. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. 112 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), ISBN 85-334-0974-5, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. 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.

CAPALBO, D.M.F. *Bacillus thuringiensis*: Fermentation Process and Risk Assessment. A Short Review. **Men Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 135-138, 1995.

CAPALBO, D.M.F. **Contribuição ao estudo da fermentação contínua de *Bacillus thuringiensis***. Campinas, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 1982. 90f.

CAPALBO, D.M.F. **Desenvolvimento de um processo de fermentação semisólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner**. Campinas, SP. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 1989. 235f.

CAPALBO, D.M.F.; VALICENTE, F.H.; MORAES, I.O.; PELIZER, L.H. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in maize. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 112-115, 2001.

CASTILHOS-FORTES, R.; AZAMBUJA, A.O.; PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. TOXICOLOGIA DE *Bacillus thuringiensis* AOS INSETOS SOCIAIS. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. XI, n. 38, p. 40-43, 2009/2010.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J, BRAVO, A. AND DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2012. Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acessado em 03 de Novembro de 2012, 22:55:00.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUN, J.; DEAN, D.H. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

Dias, D.G.; Silva, S.F.; Martins, E.S.; Soares, C.M.S.; Falcão, R.; Gomes, A.C.M.M.; Praça, L.B.; Dias, M.C.S.; Monnerat, R.G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 30, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2002. ISSN 1676 – 1340.

DIAS, J.M.C.S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 27, p. 59 – 76, 1992.

DUBOIS, N.R. Laboratory Batch Production of *Bacillus thuringiensis* Spores and Crystals. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1098-1099, 1968

DULMAGE, H.T.; YOSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, Geneva. 59 p, 1990.

ERNANDES, S.; MORAES, I.O. Utilização de Sangue de Abatedouros para Produção de *Bacillus thuringiensis* por Fermentação Submersa. **Holos Environment**, v. 1, n. 01, p. 60 – 66, 2001.

ESPINDOLA, C.B.; GUEDES, R.N.; DE SOUZA, R.C.B. Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório. **EntomoBrasilis**, v. 1, n. 1, p. 10-13, 2008.

FATORETTO, J.C.; SENA, J.A.D.; BARRETO, M.R.; LEMOS, M.V.F.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Associação de Bioensaios e Caracterização Molecular para Seleção de Novos Isolados de *Bacillus thuringiensis* Efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 737-745, 2007.

FERNÁNDEZ-LUNA, M.T.; TABASHNIK, B.E.; LANZ-MENDOZA, H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; MIRANDA-RÍOS, J. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 231–233, 2010.

FILLINGER, U.; KNOLS, B.G.J.; BECKER, N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 1, p. 37–47, 2003.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3ed. Cambridge University Press, 1971. 333p.

FIUZA, L. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; GOZE, E.; FRUTOS, R.; CHARLES, J.F. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae): evidence of shared binding sites. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1544-1549, 1996.

FIÚZA, L.M. & BERLITZ, D.L. Produtos de *Bacillus thuringiensis*: Registro e Comercialização. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. XI, n. 38, p. 58-60, 2009/2010.

FIÚZA, L.M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. XI, n. 38, p. 32-35, 2009/2010.

GERMANI, J.C. **Estudos de produção de *Bacillus sphaericus* S2 com matérias-primas regionais e de avaliação da atividade larvicida**. Porto Alegre, RS, Tese de Doutorado

apresentada à Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993. 182 f.

GOLDBERG I.; SNEH, B.; BATTAT, E.; KLEIN, D. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worms *Spodopteral littoralis* boisd. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 10, p. 419-426, 1980.

GUIDELLI-THULER, A.M.; SENA, J.A.D.; ABREU, I.L.; DAVOLOS, C.C.; ALVES, S.B.; POLANCZYK, R.A.; VALICENTE, F.H.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus Thuringiensis*: Diversidade Gênica em Isolados Lepidoptera-Específicos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 4, p. 405–414, 2008.

HABIB, M.E.M. Utilização de Bactérias no Controle de Dípteros de Importância Médica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, n. III, p. 31-34, 1989.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HU, Y.; GEORGHIOU, S.B.; KELLEHER, A.J.; AROIAN, R.V. *Bacillus thuringiensis* Cry5B Protein Is Highly Efficacious as a Single-Dose Therapy against an Intestinal Roundworm Infection in Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 3, 7 p., 2010.

IBARRA, J.E.; DEL RINCO´N, M.C.; ORDU´Z, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SANCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5269–5274, 2003.

KESHAVARZI, M.; SALIMI, H.; MIRZANAMADI, F. Biochemical and Physical Requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* For High Biomass Yield Production. **J. Agric. Sci. Technol.**, v. 7, p. 41-47, 2005.

KNIGHT, P.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 429-436, 1994.

LACEY, L.A. *Bacillus thuringiensis* sorovarety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **The Americam Mosquito Control Association**, v. 23, p. 133-163, 2007.

LECADET, M.M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D.. Construction of Novel *Bacillus thuringiensis* Strains with Different Insecticidal Activities by Transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 840-849, 1992.

LITAIFF, E.C. **Toxidade, Caracterização Molecular de *Bacillus sphaericus* da Amazônia e Parâmetros do Crescimento Microbiano para a Produção de Bioinseticida**. Manaus, AM, Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 2006. 126f.

LITAIFF ABREU, E.; TADEI, W.P.; RODRIGUES, I.B. Effectiveness of *Bacillus sphaericus* on *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) in Amazônia. **R. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 139-142, abr./jun., 2011.

LIU, B.L.; TZENG, Y.M. Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 413-418, 1998.

LOPES, J.; ARANTES, O.M.N.; CENCI, M.A. Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 1109-1113, 2010.

MAEDOWS, B.M.P.; ELLIS, B.R.D.J.; JARRETT, P. **Biological Control of Lepidopteron Pests Using *Bacillus Thuringiensis***. US Patente 5.501.852, 26 de Março de 1996.

MARCONDES, C.B. Controle de artrópodes – Princípios gerais, p. 327-342. *In: Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu, 432p, 2001.

MEDEIROS, P.T.; FERREIRA, M.N.; MARTINS, E.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, 2005.

MITTAL, P.K. Biolarvicides in vector control : challenges and prospects. **J Vect Borne Dis**, v. 40, p. 20–32, 2003.

MONNERAT, R.G.; BORDAT, D.; BRANCO, M.C.; FRANÇA, F.H. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e Inseticidas Químicos Sobre a Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:Yponomeutidae) e Seus Parasitóides. **An. Soc. Entomol. Bras.**, v. 29, n. 4, p. 723-730, 2000.

MONNERAT, R.G.; SOARES, C.M.; ROBERG, R.A.; DUMAS, V.F.; RAMOS, F.R.; PRAÇA, L.B.; MARTINS, E.S.; QUEIROZ, P.R.; SUJII, E.R. Bt-horus, um biolarvicida à base da *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de *Aedes aegypti*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 220, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2008. ISSN 1676 – 1340.

MORAES, I. O. **Ensaio de fermentação submersa para produção de inseticida bacteriano em minifermentador**. Campinas, SP, Tese de Doutorado. FEA/UNICAMP, 1976. 76f.

MORAES, I.O. **Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa.** Campinas, SP, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1973. 60 f.

MORAES, I.O.; ARRUDA, R.O.M.; ERNANDES, S. Produção de *Bacillus Thuringiensis*, para Controle de Pragas da Saúde Pública. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 4p. 2000.

MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F.; ARRUDA, R.O.M. Produção de Bactérias Entomopatogênicas. *In: Alves, S.B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª Ed., Piracicaba: FEALQ, 1163p, 1998.*

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. Dengue - instruções para o pessoal de Combate ao vetor - **Manual de normas técnicas.** 2001

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **J. Technol. Manag. Innov.,**v. 2, p. 118 – 127, 2007.

PEREIRA JUNIOR, N.; BOM, E.P.S.; FERRATA, M.A. **Tecnologia de Bioprocessos.** 1ª Ed., Rio de Janeiro: Escola de Química / UFRJ, 62p, 2008.

PINTO, L.M.N.; BERLITZ, D.L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L.M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. XI, n. 38, p. 24-31, 2009/2010.

POLANCZYK, R.A. & ALVES, S.B. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R.A. **Estudos de Bacillus thuringiensis Berliner visando ao controle de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith).** Piracicaba, SP. Tese de Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, 2004. 144f.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Rev Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

POLANCZYK, R.A.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de Amostras de Solos e sua Patogenicidade para *Spodoptera Frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev. Bras. Agrociência**, v.10, n. 2, p. 209-214, abr-jun, 2004

POLSON, K.A.; BROGDON, W.G.; RAWLINS, S.C.; CHADEE, D.D. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 117, p. 31–38, 2011.

POOPATHI, S. & ARCHANA, B. Optmization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Indian Jornal of Experimental Biology**, v. 50, p. 65-71, 2012.

POOPATHI, S. Novel Fermentation media for the production of mosquito pathogenic bacilli in mosquito control. *Formatex. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Ed. A. Méndez-Vilas, p. 349-358, 2010.

PORCAR, M; JUAREZ-PEREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 419-432, 2003.

PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

REGIS, L.; SILVA, S.B.; MELO-SANTOS, M.A.V. The Use of Bacterial Larvicides in Mosquito and Black Fly Control Programmes in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 207-210, 2000.

RIBAS, N.L.K.; RANGEL, M.A.; GABRIEL, M. Avaliação de formulações com *Bacillus thuringiensis* no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Suplemento especial, Resumo do 2º Seminário de Agroecologia de Mato Grosso do Sul. 2008b.

RIBAS, N.L.K.; RANGEL, M.A.; GABRIEL, M. Utilização de produtos bioinseticidas com *Bacillus thuringiensis* no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Suplemento especial, Resumo do 2º Seminário de Agroecologia de Mato Grosso do Sul. 2008a.

ROCHA, R.C. **Malária Urbana: fatores entomológicos envolvidos na dinâmica de transmissão e controle na cidade de Coari – AM, Brasil**. Manaus, AM. Dissertação de Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA / Fundação Universidade do Amazonas – FUA. 2002. 93f.

RODRIGUES, I.B. **Controle da Malária: Atividade larvicida de onze estirpes de *Bacillus sphaericus* contra *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlinge* e *Anopheles brasiliensis***. Manaus, AM. Dissertação de Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA / Fundação Universidade do Amazonas – FUA. 1996. 95f.

RODRIGUES, I.B.; TADEI, W.P.; SANTOS, R.L.; SANTOS, S.; BAGGIO, J.B. Controle da malária: Eficácia de formulados de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de *Anopheles* em criadouros artificiais-tanques de piscicultura e criadouros de olaria. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, p. 161–176, 2008.



SANTOS, D.T.; SARROUH, B.F.; SANTOS, J.C.; PÉREZ, V.H.; SILVA, S.S. Potencialidades e Aplicações da Fermentação Semi-Sólida em Biotecnologia. Janus, Lorena, ano 3, n. 4, 2º sem, 2006.

SANTOS, S.L. **Avaliação das Ações de Controle da Dengue: Aspectos Críticos e Percepção da População, Estudo de caso em um município do Nordeste.** Recife, PE. Dissertação de Doutorado em Saúde Pública Fundação Oswaldo Cruz (NESC/CPqAM/FIOCRUZ). 2003. 132f.

SANTOS, K.B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A.M.; SANTOS, R.B.; SANTOS, W.J.; BOAS, G.V.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.B.; MONNERAT, R. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Sodoptera eridania* (Cramer), *Sodoptera cosmoides* (Walker) e *Sodoptera frigiperda* (Smith) (Lepdoptera: Noctuide). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 216, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2008. ISSN 1676 – 1340.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**, p. 179–192. *In*: Biotecnologia Industrial, v.II. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 541p. 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SILVA, J.S. **Isolamento, Caracterização Molecular e Atividade Larvicida de Isolados de *Bacillus Thuringiensis* Berliner 1911 do Amazonas em *Aedes Aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae).** Manaus, AM. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Instituto Nacional De Pesquisas da Amazônia – INPA. 2011. 92f.

SOCOL, C.R.; POLLON, T.E.V; FENDRICH, R.C.; PROCHMANN, F.A.; MOHAN, R.; BLASKOWSKI, M.M.M.; MELO, A.L.A.; CARVALHO, C.J.B.; THOMAZ-SOCOL, V. Development of a Low Cost Bioprocess for Endotoxin Production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Intended for Biological Control of *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 121-130, 2009.

SOUZA FILHO, A. **Isolamento e Caracterização Molecular de *Bacillus thuringiensis* do Estado do Amazonas.** Manaus, AM. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas. 2005. 55f.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B.; SANTOS, J.M.M.; RAFAEL, M. S., PASSOS, R.A.; COSTA, F. M.; PINTO, R.C.; OLIVEIRA, A.E.M. O papel da entomologia no controle da malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 22-26, 2007.

TADEI, W.P. Controle da Malária e Dinâmica dos Vetores na Amazônia. 7ª Reunião Especial da SBPC. **Anais/Resumos** (CD-RUM). Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência: 1-6. 2001.

TADEI, W.P.; DUTARY-THATCHER, B.; SANTOS, M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 2, p. 325-335, 1998.

TADEI, W.P.; RODRIGUES, I.B. O Controle Biológico de Anofelinos na Amazônia. 19º Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais (CD-RUM)**. Manaus: Sociedade Brasileira de Entomologia, n. 1, p. 1-6, 2002.

TADEI, W.P.; THATCHER, B.D.; SANTOS, J.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B.; TERRAZAS, W.C.; BÁGGIO, J.B. Malária em Manaus: Fatores Epidemiológicos envolvidos na dinâmica de Transmissão. I. Densidade Populacional, Caracterização dos criadouros e Sazonalidade. Relatório Final - PCMAM. Biblioteca INPA. 64pp. 1996.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. de Saúde Pública**, n. 18, p. 867-871, 2002.

THOMAS, W.E.; ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 60, p. 181-197, 1983.

VALICENTE, F.H. Caracterização Molecular dos Isolados 344 e 1644 de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), Eficazes no Controle da Lagarta-do-Cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 220, Embrapa Milho e Sorgo. 2010. ISSN 1679-0154.

VALICENTE, F.H.; ZANASI, R.F.; BOREGAS, K.G.; BARRETTO, M.R. ***Bacillus thuringiensis* in Brazil: Geographical Distribution and Fermentation Media for Production**. 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact, Victoria BC, 2005

WHO. 2010. **World Malaria Report**. 2010. 238pp.

WOLFF, L.F.; SANTOS, R.S.S.; MELO, M. Controle Biológico de Traça-da-cera com *Bacillus thuringiensis* para a conservação de favos na apicultura sustentável e agricultura familiar. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 97, Embrapa Clima Temperado. 2009. ISSN 1981-5980.

YAMASHITA, S.; KATAYAMA, H.; SAITOH, H.; AKAO, T.; PARK, Y.S.; MIZUKI, E.; OHBA, M.; ITO, A. Typical Three-Domain *Cry* Proteins of *Bacillus thuringiensis* Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cells. **J. Biochem**, v. 138, p. 663-672, 2005.