



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

**OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO
DE TOXINAS POR *Bacillus thuringiensis* SUBSP. *israelensis*
EMPREGANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Londrina
2009

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

**OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO
DE TOXINAS POR *Bacillus thuringiensis* SUBSP. *israelensis*
EMPREGANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof^o Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez

Co-Orientadora: Dr^a. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas

Londrina
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Angelo, Elisangela Andrade

Otimização de meio de cultivo para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* empregando resíduos agroindustriais/ Elisangela Andrade Angelo. – Londrina, PR [s.n], 2009

Orientador: Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.
Departamento de Ciências de Alimentos.

1. *Bioinseticida. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. *Aedes aegypti*. 4. Otimização. I Castro-Gómez, Raúl Jorge Hernan. II Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Ciências de Alimentos. III Título.

ELISANGELA ANDRADE ANGELO

**OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE
TOXINAS POR *Bacillus thuringiensis* SUBSP. *israelensis* EMPREGANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez

Prof^a Dr^a. Olívia Márcia Nagy Arantes

Prof^a Dr^a. Sandra Garcia

Londrina, 16 de Março de 2009

Dedico este livro aos amigos

Aos que se tornaram familiares,
Aos que nasceram familiares
e aos que conheci antes de ontem.

Dedico tanto aos que me deixam louco,
Quanto aos que enlouqueço.

Aos que me criticam em tudo,
E a um ou outro que atura
Minha “chatura”

Aos amigos que correm,
Aos amigos que contemplam.

Aos que me consideram muito,
E aos muitos que, com razão, fazem pouco.

Aos que conhecem o que penso,
E aos que só conhecem o que faço.

Aos que passam o dia todo comigo
e aos que estão todo o tempo em mim.

Este livro é a soma de todos vocês.
E se ele não é melhor,
É por falta de memória,
Mas não por falta de amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez pela orientação e paciência durante a realização desse trabalho.

À professora Dr^a. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas pela co-orientação, companheirismo e amizade.

Ao professor Dr. José Lopes por ceder o laboratório, o qual coordena, para a realização dos bioensaios.

Ao professor Amarildo Passini do Departamento de Agronomia (UEL) por fornecer a análise da farinha de crisálida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e tecnologia de Alimentos pela solicitude apresentada e por compartilhar seus conhecimento e suas experiências.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

A indústria de fiação de seda Bratac S.A. pelo fornecimento da farinha de crisálida.

A todos os colegas de curso, em especial a Andréia, Dani, Fran, Gis, Karlinha, Lílian, Romi, Cássia e Léo: com vocês o caminho se tornou menos tortuoso e mais alegre.

A Gisele e Kérley pelas sugestões, por compartilhar experiências, pelas boas conversas durante o trabalho de laboratório, enfim, pela amizade.

À Mari pelas descontrações, conversas e ajuda com o inglês (Thank you!).

À Raquel pelo companheirismo, confidências e amizade.

À minha família, por me apoiar em minhas decisões e acreditar em meus sonhos, por mais difíceis que pareçam.

Ao meu irmão Adilson pelo carinho, apoio e amizade (amo você!).

Ao meu amigo e companheiro Leandro, por suportar minha ausência, meu mau-humor e por ser ombro sempre presente nos momentos difíceis (amo você!).

À Deus por ter propiciado, há seu tempo, essa experiência em minha vida.

ANGELO, Elisangela Andrade. **Otimização de meio de cultivo para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* empregando resíduos agroindustriais**. 2009. 88 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. 2009.

RESUMO

O controle de insetos é realizado, em sua maioria, por produtos químicos; cujos efeitos cumulativos ocasionam grandes prejuízos ambientais e à saúde humana, destacando-se ainda a rápida seleção de insetos resistentes. O controle biológico por entomopatógenos é uma alternativa eficiente, principalmente devido a sua alta especificidade, menor frequência de resistência nos insetos alvos e baixo efeito residual no ambiente. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva esporulante, produtora de cristais protéicos com atividade inseticida. Apesar do amplo uso *B. thuringiensis* no controle biológico, há poucos trabalhos publicados quanto a sua produção, visto que muitas informações são segredos industriais. Além disso, a diversidade de subprodutos da agroindústria são fontes adequadas de carbono e nitrogênio para o cultivo de microrganismos e podem contribuir significativamente para a redução de custos na produção de biomoléculas. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo otimizar um meio de cultura, empregando resíduos agroindustriais, para produção de toxinas por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, utilizando a metodologia de superfície de resposta. Foi estudada também a cinética de crescimento associada à produção de toxina pela bactéria, bem como a toxicidade da cultura pós-fermentação, por um período de 28 dias. As fontes de nitrogênio orgânico estudadas foram: farinha de soja, farinha de crisálida, peptona bacteriológica e uréia agroindustrial. As fontes de carbono estudadas foram sacarose, glicose e fécula de mandioca. Como fonte de nitrogênio inorgânico foi estudada sulfato de amônia. O parâmetro analisado para a otimização do meio foi toxicidade, por meio de bioensaio contra *Aedes aegypti*. Foram estudados também o percentual de esporulação e o crescimento (por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônia). A farinha de crisálida e a glicose foram as fontes mais adequadas de nitrogênio orgânico e carbono, respectivamente, para a produção de toxinas. A superfície de resposta mostrou-se um método eficaz para a otimização, resultando em um meio com as seguintes faixas de concentrações das fontes de carbono e nitrogênio: glicose 0,3 a 0,55g/L; farinha de crisálida 55 a 58g/L e sulfato de amônia 0,6 a 1,1g/L. O meio otimizado resultou em uma toxicidade de 0,703ppm (v/v), valor superior a de meios comumente utilizados para *B. thuringiensis israelensis*. A toxicidade da cultura aumentou com o tempo de cultivo, sendo máxima com 96 horas. A cultura manteve-se tóxica durante os 28 dias de análise, sendo que o armazenamento sem refrigeração mostrou-se mais eficaz. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento de uma produção local e para o aproveitamento de resíduos agroindustriais da região.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico. *Aedes aegypti*. Superfície de resposta. Produção. Resíduos agroindustriais.

ANGELO, Elisangela Andrade. **Medium optimization for toxins productions by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* using agro industrial byproducts**. 2009. 88 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Insect control is realized, in its majority, for chemical products, whose cumulative effects become problematic due to the environment and to human's healthy and also the selection of resistant insects. Biological control by entomopathogen is an efficient alternative, mainly due to its own specification, lower resistance in the target insects and low residual effect on the environment. *Bacillus thuringiensis* is a Gram-positive spore-forming bacterium that produces a parasporal crystal protein toxic for many insects. Besides this bacteria is used widely worldwide in controlling insects, there aren't many studies about its production, because many information are industrial secrecy. Besides, the diversity of agro industrial byproducts are appropriate sources of carbon and nitrogen for the growth of microorganism and significantly contribute for the reduction of cost of biomolecule. Therefore, the object of this study was to optimize the culture medium using agro industrial byproducts for producing toxins by *B. thuringiensis* subsp *israelensis*, using the Response Surface Analyses (RSA) methodology. We also studied the kinetics of growth and production of the toxin by the bacteria and its post-fermentation toxicity for 28 days. The organic nitrogen sources were: soybean meal, *Bombix mori* pupae meal (BMP), bacterial peptone and agricultural urea. The source of carbon studied were glucose, sucrose and cassava starch. The inorganic nitrogen source studied was ammonium sulfate. The parameter used for the medium optimization was toxicity, evaluated by bioassays against *Aedes aegypti*. It was also studied the percentage of the bacteria sporulation and growth (Colony Forming Units, CFU,). The BMP and glucose were the most appropriate sources of organic nitrogen and carbon, respectively, for toxins production. The RSA, proved to be an effective method for medium optimization, resulting in a medium composition for maximal response with the following ranges of carbon and nitrogen concentrations: glucose 0,3 to 0,55gL⁻¹; BMP 55 to 58gL⁻¹ and ammonium sulfate 0,6 to 1,1gL⁻¹. The optimized medium resulted in a toxicity of 0,703ppm (v/v), which is above the mediums toxicity commonly obtained used *B. thuringiensis israelensis*. The culture medium toxicity increased with cultivation time until 96 hours. The culture medium toxicity remains stable under refrigeration temperatures during 28 days and when it was kept without refrigeration, the response was more effective. These results contribute to the development of a local technology and to promote the use of agro industrial byproducts produced in the region.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Biological control. *Aedes aegypti*. Response Surface Analyses. Production. Agro industrial byproduct.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Cultura lisada de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> , evidenciando os esporos elipsóides e os cristais protéicos arredondados	19
Figura 2.2 – Modos de ação das toxinas Cry	22
Figura 2.3 – Estrutura tridimensional das proteínas Cry, produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	24
Figura 5.1 – Cultura de <i>B. thuringiensis israelensis</i> em diferentes momentos de cultivo.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –	Principais ingredientes utilizados em meios de cultivo de bactérias entomopatogênicas e suas concentrações.....	31
Tabela 4.1 –	Planejamento experimental utilizado na etapa de seleção das fontes de nutrientes	41
Tabela 4.2 –	Planejamento fatorial fracionado 23-1	42
Tabela 4.3 –	Níveis das variáveis no primeiro planejamento fatorial incompleto da etapa de otimização das fontes de nutrientes.....	42
Tabela 4.4 –	Níveis das variáveis no segundo planejamento fatorial incompleto da etapa de otimização das fontes de nutrientes.....	43
Tabela 4.5 –	Níveis das variáveis no planejamento fatorial completo (23) com repetição no ponto central e pontos estrelas.....	43
Tabela 4.6 –	Planejamento fatorial completo 23 com repetição no ponto central e pontos estrelas	44
Tabela 5.1 –	Resultados do bioensaio, UFC/mL e porcentagem de esporulação na etapa de seleção das fontes de nutrientes.	50
Tabela 5.2 –	Efeito das fontes de nutrientes testadas sobre a mortalidade das larvas (bioensaio), crescimento microbiano (UFC/ml) e esporulação na etapa de seleção dos componentes do meio.	51
Tabela 5.3 –	Resultados do bioensaio na primeira etapa de otimização.....	53
Tabela 5.4 –	Efeito das fontes testadas sobre a toxicidade do meio avaliada por meio do bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto – otimização das fontes).....	54
Tabela 5.5 –	Resultados do bioensaio na segunda etapa de otimização..	58
Tabela 5.6 –	Efeito das fontes testadas sobre a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto – otimização das fontes).....	59
Tabela 5.7 –	Ensaio para confirmação do ponto central.....	61
Tabela 5.8 –	Respostas do Delineamento Composto Central Rotacional (planejamento fatorial completo, com repetição no ponto central e pontos estrelas).....	63

Tabela 5.9 –	Análise de variância ($p < 0,05$) para a resposta bioensaio do delineamento composto central rotacional.....	63
Tabela 5.10 –	Efeito das fontes de nutrientes sobre o bioensaio, crescimento e esporulação (delineamento composto central rotacional).....	64
Tabela 5.11 –	Valores previstos para o bioensaio em diferentes concentrações das fontes de nutrientes.	67
Tabela 5.12 –	Custos em Reais dos meios de cultivo: Arcas adaptado e Farinha de crisálida otimizado.	69

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1** – Superfície de resposta para variáveis glicose e farinha de crisálida, tendo como resposta a toxicidade avaliada por bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto) 54
- Gráfico 5.2** – Superfície de resposta para variáveis sulfato de amônia e farinha de crisálida, tendo como resposta a toxicidade avaliada por bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto). 55
- Gráfico 5.3** – Superfície de resposta (3 dimensões) para variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta a toxicidade avaliada por bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto). 56
- Gráfico 5.4** – Superfície de resposta (plana) para variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta a toxicidade avaliada por meio do bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto).. 57
- Gráfico 5.5** – Superfície de resposta para variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto).. 59
- Gráfico 5.6** – Superfície de resposta para variáveis sulfato de amônia e farinha de crisálida, tendo como resposta a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto). 60
- Gráfico 5.7** – Superfície de resposta para variáveis farinha de crisálida e glicose, tendo como resposta a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto).. 60
- Gráfico 5.8** – Superfície de resposta para as variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta o bioensaio (delineamento composto central rotacional). 65
- Gráfico 5.9** – Superfície de resposta para as variáveis farinha de crisálida e glicose, tendo como resposta o bioensaio (delineamento composto central rotacional). 65
- Gráfico 5.10** – Superfície de resposta para as variáveis farinha de crisálida e sulfato de amônia, tendo como resposta o bioensaio (delineamento composto central rotacional). 66
- Gráfico 5.11** – Valores observados e previstos para o bioensaio (% de morte). 67

Gráfico 5.12 – Correlação entre a biomassa (mg/mL) mensuradas pelas metodologias de gravimetria e turbidimetria.	70
Gráfico 5.13 – Crescimento microbiano (biomassa) ao longo do cultivo (96 horas).	71
Gráfico 5.14 – Potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do cultivo (96 horas).....	73
Gráfico 5.15 – Toxicidade da cultura durante o armazenamento.	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
2.2	<i>Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis</i>	20
2.3	PROTEÍNAS CRY	21
2.4	PROTEÍNAS CYT	24
2.5	OUTRAS TOXINAS PRODUZIDAS POR <i>B. thuringiensis</i>	25
2.6	PRODUÇÃO DE <i>B. thuringiensis</i>	26
2.7	MEIOS DE CULTURA	29
2.8	BIOENSAIO	33
2.9	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E USO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	MICROORGANISMO	38
4.2	RECUPERAÇÃO E MANUTENÇÃO DA CULTURA	38
4.3	PREPARO DO PRÉ-INÓCULO	38
4.4	CONDIÇÕES DE CULTIVO	39
4.5	SELEÇÃO DAS FONTES DE NUTRIENTES	39
4.6	OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE NUTRIENTES SELECIONADAS	41
4.7	ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE TOXINAS.....	44
4.8	TOXICIDADE DA CULTURA DE <i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i> PÓS- FERMENTAÇÃO	45
4.9	MÉTODOS ANALÍTICOS	45
4.9.1	Bioensaio	45
4.9.2	Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	46

4.9.3	Quantificação de Esporos.....	46
4.9.4	Biomassa Seca (Gravimetria).....	47
4.9.5	Turbidimetria.....	47
4.9.6	Lâminas para Análise Microscópica	48
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	SELEÇÃO DAS FONTES DE NUTRIENTES	49
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE NUTRIENTES SELECIONADAS .	52
5.2.1	Planejamentos Fatoriais Incompletos	52
5.2.2	Planejamento Fatorial Completo	62
5.3	CINÉTICA DE CRESCIMENTO ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE TOXINAS.....	70
5.4	TOXICIDADE DA CULTURA DE <i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i> DURANTE ARMAZENAMENTO.....	74
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXOS	85
	ANEXO A –Processo de produção de farinha de crisálida pela indústria de fiação de seda Bratac S.A.	86
	ANEXO B – Soluções utilizadas na coloração das lâminas de <i>B. thuringiensis</i>	87
	ANEXO C – Análise da constituição química de farinha de crisálida.....	88

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que existam cerca de 2,5 milhões de espécies de insetos, das quais 10% causam danos ao ser humano ou perdas econômicas na pecuária ou na agricultura (ALVES, 1998). Muitas doenças de interesse da saúde pública, como malária, dengue, febre amarela, filariose e doença de chagas são transmitidas por insetos vetores. Em geral, os países mais atingidos por estas doenças são os tropicais e subtropicais, devido principalmente às suas características climáticas favoráveis à proliferação de insetos. O crescente aquecimento global demanda preocupação especial, estendendo as áreas propícias a esta proliferação também a regiões atualmente com clima temperado.

O controle atual da população de insetos é realizado, principalmente, por inseticidas químicos, cujo uso indiscriminado e massivo causa danos ambientais e à saúde humana. Produtos químicos com alta toxicidade, porém com baixa especificidade e alto efeito residual, prejudicam o meio ambiente, além de contribuírem para a existência de considerável número de espécies de insetos com populações resistentes, inviabilizando a aplicação de tais produtos.

Uma alternativa aos inseticidas químicos é o controle biológico, que pode ser feito com o uso racional de entomopatógenos, que constituem os componentes ativos dos bioinseticidas ou inseticidas biológicos.

Entre as vantagens dos bioinseticidas destacam-se: alta especificidade, menor risco ambiental e à saúde humana, menor frequência de resistência nos insetos alvo e a possibilidade do entomopatógeno se multiplicar no ambiente e, com isso, aumentar sua permanência. Como desvantagens, destacam-se espectro de ação restrito e maior suscetibilidade às condições ambientais. Estas desvantagens podem ser atenuadas com o uso de boas formulações e estudos para aplicação dos produtos, a fim de torná-los mais resistentes às condições ambientais e com maior tempo de prateleira.

A comercialização de bioinseticidas corresponde a cerca de 5% do mercado mundial de pesticidas. Porém, o uso destes produtos vem crescendo dez vezes mais do que o uso de inseticidas químicos. As bactérias destacam-se como promissoras no controle biológico. Entre estes microrganismos, *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o mais utilizado como bioinseticida. Estima-se que os produtos à base dessa bactéria correspondam a cerca de 90 a 97% do mercado mundial de bioinseticidas (BRAR *et al.*, 2006).

Entre as razões para o sucesso dos produtos à base de *B. thuringiensis* estão: alta toxicidade aos insetos alvos, capacidade de esporulação e o caráter monogênico de sua principal toxina, o que facilita a manipulação genética da mesma.

A subespécie *israelensis* de *B. thuringiensis* mostrou-se eficaz no combate a dípteros, Ordem onde se encontram muitos gêneros com espécies vetores de doenças, como *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*. Muitos produtos feitos a partir dessa subespécie vêm sendo utilizados há mais de trinta anos em países africanos, sob a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Os maiores produtores de inseticidas à base de *B. thuringiensis* são Estados Unidos e Canadá. O desenvolvimento de produção local, com linhagens mais adaptadas às condições brasileiras e com meios de cultivo alternativos, poderia tornar produtos à base de *B. thuringiensis* mais competitivos no Brasil.

Embora a produção de *B. thuringiensis* seja bem estudada, muitas informações necessárias ao desenvolvimento de uma produção local não estão disponíveis na literatura. Isto ocorre porque muitas informações são propriedades de indústrias que comercializam produtos à base de *B. thuringiensis*.

Considerando a necessidade do Brasil em controlar os insetos vetores de doenças ou pragas agrícolas, tendo em vista as vantagens do controle biológico e a dificuldade em se obter informações sobre a produção de *B. thuringiensis*, torna-se necessário o estudo e desenvolvimento de tecnologias novas e acessíveis para produção de bioinseticidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis foi descrito em 1915 na Alemanha, isolado a partir de traça de farinha (*Anagasta kuehniella*). Anteriormente, em 1902, no Japão, o pesquisador Ishiwata já havia isolado uma bactéria a partir de *Bombix mori*, que posteriormente se soube ser também uma subespécie de *B. thuringiensis*. No entanto, a comercialização de produtos a base desta bactéria só se iniciou em 1938 na França, com o bioinseticida comercializado sob o nome de “Sporeine” (BRAR et al., 2006; CAPALBO et al., 2004; VIDAURRE, 1996).

Pertencente à família Bacillaceae, a qual engloba a maioria das espécies formadoras de esporos, *B. thuringiensis* é um bastonete Gram-positivo, com célula vegetativa de 1,0 a 1,2 μ m de largura por 3,0 a 5,0 μ m de comprimento, geralmente móveis. O esporo dessa bactéria possui formato elipsoidal e localiza-se na região central ou paracentral quando no interior da célula mãe. A espécie é aeróbia não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 °C. *B. thuringiensis* apresenta um amplo complexo enzimático, o que lhe permite utilizar uma variedade de substratos. A principal característica que distingue a espécie das outras do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal protéico (GLARE; O’CALLAGHAN, 2000; HABIB; ANDRADE, 1998; MORAES et al., 2001; VILAS-BÔAS et al., 2007).

Devido às suas características fisiológicas como formação de esporos e metabolismo aeróbio não estrito, *B. thuringiensis* apresenta resistência a condições adversas, o que contribui para seu alto potencial no controle biológico (MORAES et al., 1998).

O cristal protéico típico de *B. thuringiensis* é, em geral, produzido durante a esporulação e constitui o principal ingrediente ativo dos bioinseticidas à base dessa bactéria. Este cristal é tóxico para várias espécies de insetos, destacando-se no controle de: Lepidóptera, Díptera e Coleóptera. Porém, há subespécies de *B. thuringiensis* que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Himenóptera, Hemíptera, Ortóptera, Phthraphera e também para alguns nematóides, protozoários e ácaros (BRAR et al., 2006; GLARE; O’CALLAGHAN, 2000; SCHNEPF et al., 1998).

Os cristais de *B. thuringiensis* são formados principalmente por proteínas denominadas Cry, antigamente também conhecidas como δ -endotoxinas, e por proteínas

citolíticas (Cyt) (BRAVO et al., 2007). Ao final da esporulação, o cristal protéico corresponde a cerca de 20% a 30% do peso seco da célula, sendo liberado no momento da lise celular (ARANTES et al., 2002; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). A Figura 2.1 apresenta esporos e cristais de *B. thuringiensis* liberados com a lise celular, vistos em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes.

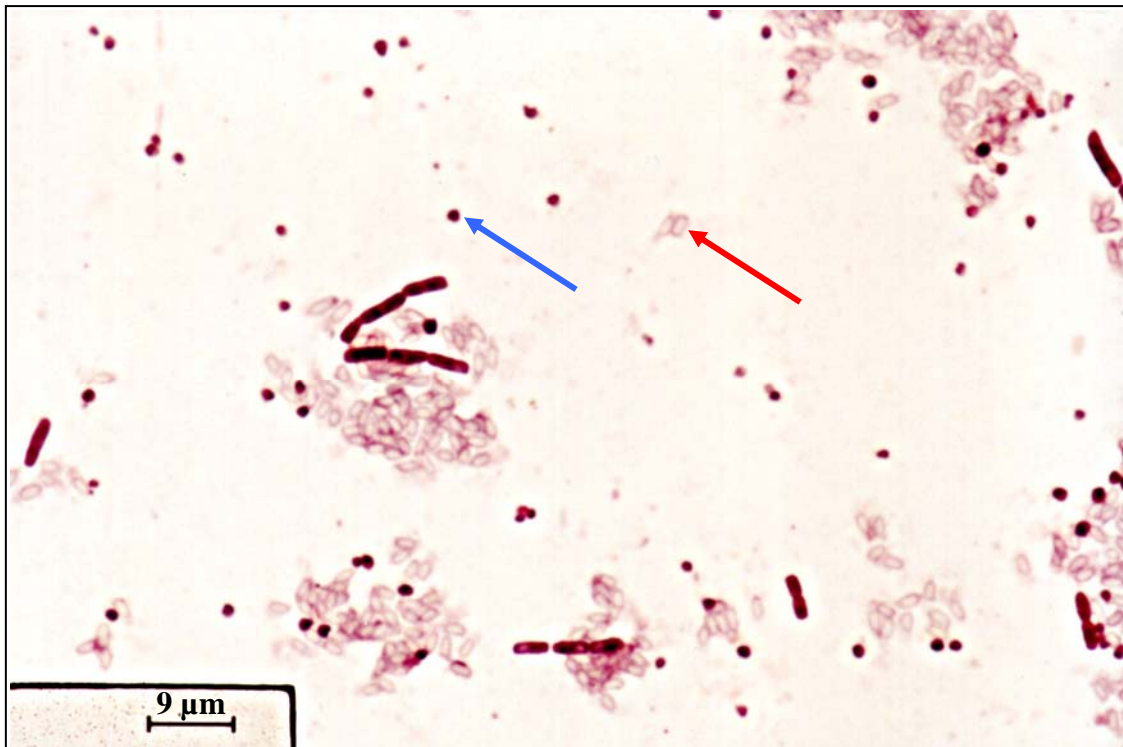


Figura 2.1 – Cultura lisada de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, evidenciando os esporos elipsóides (seta vermelha) e os cristais protéicos arredondados (seta azul). Aumento de 1000 vezes. Coloração: Amido-Black e Fucsina.

Fonte: Cedido por Dr^a. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas; Laboratório de Bioinseticida / Departamento de Biologia Geral/ Universidade Estadual de Londrina.

Bacillus thuringiensis já foi isolado de diversos ambientes, destacando-se solos, insetos vivos ou mortos, grãos estocados, amostras de água, entre outros. Embora muitos sorotipos tenham sido isolados de amostras de solo, sabe-se que o esporo pode persistir por muito tempo neste ambiente, porém essa bactéria não é capaz de se multiplicar naturalmente no solo ou na água. Pesquisas recentes apontam o inseto como o hábitat de *B. thuringiensis*, pois é principalmente neste ambiente que ocorre sua multiplicação e interações genéticas (RAYMOND et al., 2008; SUZUKI et al., 2004, VILAS-BÔAS et al., 2000).

2.2 *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*

A ordem de insetos Díptera possui muitos vetores de patógenos, destacando-se os Gêneros *Aedes* (Meigen, 1818), *Culex* (Linnaeus, 1758) e *Anopheles* (Meigen, 1818). Entre os patógenos transmitidos por estes insetos destacam-se os causadores da dengue, malária, filariose, encefalites e febre amarela. Muitos destes vetores já apresentam resistência a inseticidas químicos. Durante muito tempo procurou-se uma subespécie de *B. thuringiensis* capaz de controlar com eficiência as populações de Díptera. Em 1976/77, Goldberg e Margalit isolaram e descreveram a variedade *israelensis* (Bti) a partir da água de uma lagoa de alta salinidade. Esta subespécie apresentou-se com alto potencial no controle de larvas de algumas espécies de Díptera. Desde então, Bti vem sendo aplicado no controle biológico (BECKER; MARGALIT, 1993; CAPALBO *et al.*, 2004, GOLDEBERG; MARGALIT, 1977; VIDAURRE, 1996).

Devido ao seu complexo modo de ação, é difícil encontrar dípteros resistentes às toxinas de *B. thuringiensis subsp. israelensis*. Esta subespécie tem sido utilizada em vários países da África, na China, na Alemanha e na Austrália (BECKER; MARGALIT, 1993; ÖSKAN *et al.*, 2003; RUSSEL; KAY, 2008).

A segurança ambiental de *B. thuringiensis israelensis* tem sido estudada e numerosos testes com animais não-alvos realizados. Em alguns estudos com mamíferos, por exemplo, fez-se a administração de doses altas de Bti (10^8 bactérias/animal) via subcutânea, oral, intraperitoneal, ocular e por inalação; estes testes revelaram que esta subespécie é inócua para mamíferos. Além desses estudos, o fato de não haver registro de malefícios a outros animais em locais onde produtos a base de Bti são utilizados, comprovam sua segurança ambiental. Seu uso é permitido nos Estados Unidos desde 1981 (BECKER; MARGALIT, 1993).

O cristal protéico de Bti é formado basicamente por variações de proteína Cry e Cyt; em geral, tem forma arredondada, como apresentado na Figura 1, sendo composto principalmente pelas proteínas Cry: Cry4A (125KDa), Cry4B (134KDa) e Cry11A (67KDa).

2.3 PROTEÍNAS CRY

As proteínas Cry e Cyt, principais constituintes dos cristais que caracterizam *B. thuringiensis*, são codificadas por genes que geralmente se localizam em plasmídios e, com menor frequência, no cromossomo bacteriano. O cristal protéico foi descoberto em 1953 por Hannay (BRAVO *et al.*, 2007; HABIB; ANDRADE, 1986; LERECLUS, *et al.*, 1993).

Atualmente estão descritas 436 proteínas Cry, sendo que a cada ano novas proteínas são descobertas. Somente no ano de 2008, foram descritas 42 novas proteínas (CRICKMORE *et al.*, 2008). De acordo com a definição mais aceita, uma proteína é considerada Cry quando forma uma inclusão paraesporal (cristal) em *B. thuringiensis*, exibe algum grau de toxicidade a insetos alvos, ou apresente seqüência de aminoácidos similar a uma proteína Cry já descrita (BRAVO *et al.*, 2007; SCHNEPF, *et al.*, 1998).

Uma mesma subespécie de *B. thuringiensis* pode conter várias cópias de um mesmo gene *cry* ou de genes *cry* diferentes, sendo que as proteínas produzidas por estes genes poderão formar um ou mais cristais (LERECLUS *et al.*, 1993; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

As proteínas Cry são sintetizadas na forma de protoxinas, portanto, sua ação depende da ativação, a qual ocorre no inseto. Atualmente, há dois modelos, baseados em dados experimentais, que explicam o modo de ação das toxinas Cry. As primeiras etapas desses dois modelos são idênticas: após a ingestão dos cristais, esses são solubilizados no intestino do inseto, local com pH alcalino, liberando as protoxinas por clivagem por proteases. Ao final dessas etapas, são formadas toxinas ativas, com cerca de 60 a 70% do tamanho da protoxina. A toxina ativa é capaz de ligar-se a receptores específicos presentes nas células das microvilosidades intestinais do inseto (BRAVO *et al.*, 2007; SCHNEPF, *et al.*, 1998).

O modelo de ação denominado “formação de poros” é o mais antigo e parece ser o mais comum entre as diferentes ordens de insetos (Dípteros, Lepidópteros e Coleópteros). Segundo esse modelo, a ligação da toxina com receptores específicos levaria a formação de oligômeros de toxinas, os quais se ligariam a receptores secundários da membrana da célula intestinal. Como resultado dessa ligação, ocorreria a inserção da toxina oligomérica na membrana da célula epitelial intestinal, resultando em poros nesse epitélio (BRAVO *et al.*, 2007; BRAVO; SOBERÓN, 2008; HABIB; ANDRADE, 1986).

O modelo mais atual que explica a ação de toxinas Cry é denominado “sinal de transdução” e foi estudado em apenas poucos insetos-alvos. De acordo com esse modelo, a

ligação da proteína Cry com receptores específicos, induziria uma série de reações intracelulares, que envolvem a proteína G e a adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A. Todas essas conseqüências levam a um desequilíbrio da pressão interna celular, danificando-a (BRAVO; SOBERÓN, 2008).

A Figura 2.2 apresenta um esquema que resume os modelos de ação por “formação de poros” e por “sinal de transdução”.

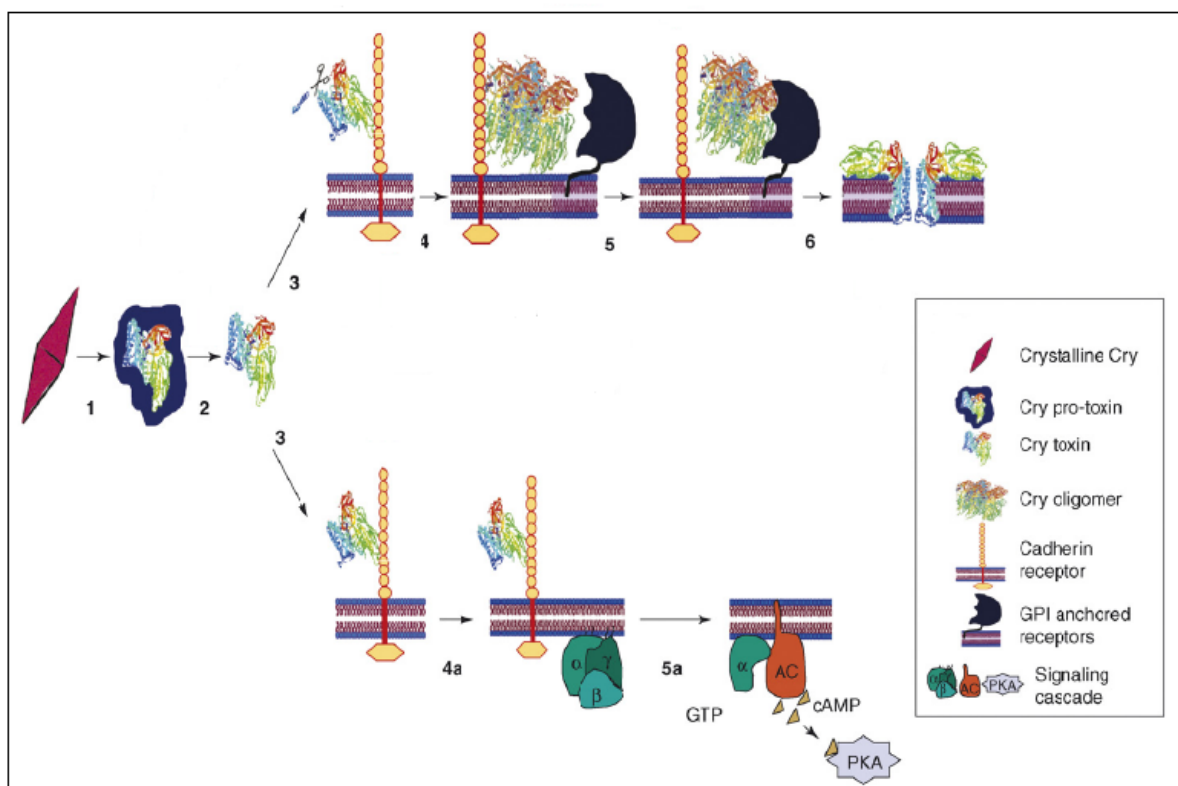


Figura 2.2 – Modos de ação das toxinas Cry. Os passos 1 a 3 são iguais nos dois modelos. O modelo “formação de poros” está representado na porção superior pelos números 4 a 6. A etapa 4 refere-se à oligomerização das toxinas, a 5 à ligação ao segundo receptor e a etapa 6 à inserção da toxina na membrana e formação dos poros. O modelo “sinal de transdução” está representado na porção inferior pelos números 4a e 5a. A etapa 4a refere-se à ligação da toxina ao receptor e estimulação da proteína G, que estimularia a adenilato ciclase (etapa 5a) e após uma série de reações em cascata, comprometeriam o equilíbrio interno celular.

Fonte: Bravo e Soberón, 2008.

A ação das toxinas, seja por qualquer um dos modelos, resulta na paralisia do aparelho digestório, ocasionando morte por inanição, paralisia geral dos músculos e

septicemia (BRAVO *et al.*, 2007; BRAVO; SOBERÓN, 2008; HABIB; ANDRADE, 1986; VALLETE-GELY *et al.*, 2008).

A formação de proteínas Cry é determinada por genes denominados *cry* e uma mesma linhagem de *B. thuringiensis* pode conter um único gene *cry* ou várias cópias de um mesmo. Como grande parte dos genes *cry* localiza-se em plasmídios conjugativos, os sorotipos podem apresentar uma grande combinação de genes, o que resulta na ampla variedade de perfis de toxicidade (CAPALBO *et al.*, 2004; LERECLUS *et al.*, 1993).

A transcrição da maioria dos genes *cry* é dependente do fator sigma, produzido durante o processo de esporulação, por isso a maior parte das proteínas que compõem o cristal é produzida durante essa etapa. Apenas uma pequena parcela de genes *cry* é regulada independentemente da esporulação, sendo, portanto, expressos também durante o crescimento vegetativo. Em ambos os casos, a proteína Cry é fruto do metabolismo secundário (ARANTES *et al.*, 2002; LERECLUS *et al.*, 1993).

A massa molecular das proteínas Cry varia entre 40 e 140KDa. A molécula destas proteínas é globular, formada por três domínios estruturais ligados entre si por pequenas pontes. Até o momento, seis proteínas Cry tiveram suas estruturas bem determinadas por cristalografia de raios-X (Figura 1.3). Estas proteínas apresentaram um alto grau de similaridade entre seus domínios, o que indica que apresentam um modo de ação bastante similar. O domínio 1 (N-terminal) é formado por cadeias polipeptídicas com formato de α -hélices, sendo uma central (hidrofóbica), cercada por 6 cadeias marginais. O domínio 2 é composto por três cadeias polipeptídicas antiparalelas com formato de β -folha pregueada. Já o domínio 3 apresenta o formato de β -sandwich (BRAVO *et al.*, 2007).

Embora estudos atuais indiquem que várias porções dos diferentes domínios da proteína se insiram na membrana no momento de formação dos poros, acredita-se que o domínio 1 seja o principal responsável pela inserção (NAIR; DEAN, 2008). Os domínios 2 e 3 apresentam similaridades estruturais com cadeias polipeptídicas que se ligam a carboidratos e estariam envolvidos principalmente no reconhecimento de receptores presentes na membrana das células dos insetos-alvo (BRAVO *et al.*, 2007).

Durante muito tempo, a nomenclatura das proteínas Cry foi feita de acordo com o inseto-alvo, desta forma, eram classificadas como Cry I as proteínas tóxicas a lepidópteras, Cry II tóxicas a lepidópteras e dípteras, Cry III contra coleópteras, Cry IV contra dípteras. Devido às constantes descobertas de novas proteínas Cry, tal sistema mostrou-se inconsistente e, atualmente a classificação é feita baseando-se na seqüência de aminoácidos

das proteínas. Periodicamente, o banco de dados *on-line* sobre proteínas de *B. thuringiensis* atualiza a classificação e nomenclatura de tais proteínas (CRICKMORE *et al.*, 1998; 2008).

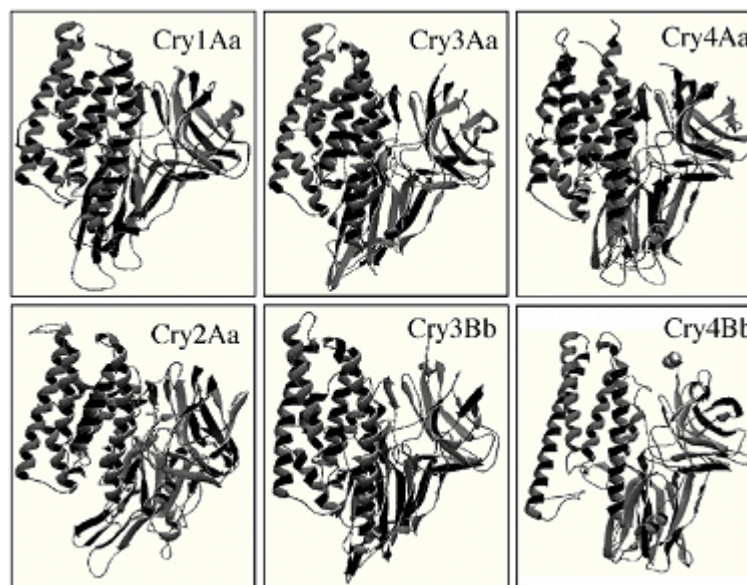


Figura 2.3 – Estrutura tridimensional das proteínas Cry, produzidas por *B. thuringiensis*. Nota-se que a estrutura geral das proteínas Cry apresentadas acima é conservada.

Fonte: BRAVO *et al.*, 2007.

2.4 PROTEÍNAS CYT

As proteínas Cyt são definidas como uma inclusão paraesporal de *B. thuringiensis* que apresenta atividade hemolítica. Estas proteínas são formadas por apenas um domínio, composto por duas cadeias exteriores em forma de α -hélice, e uma cadeia interna em forma de β -folha pregueada. Atualmente são conhecidas 27 proteínas Cyt classificadas em quatro grupos principais: Cyt1A, Cyt1B, Cyt1C, Cyt2A e Cyt2B. O mesmo comitê responsável pela classificação das proteínas Cry, também gerencia a classificação e nomenclatura das proteínas Cyt (BRAVO *et al.*, 2007; CRICKMORE *et al.*, 1998; 2008).

Assim como as proteínas Cry, as Cyt também são sintetizadas na forma de protoxinas. No interior do inseto, as proteínas Cyt sofrem quebras, liberando a toxina ativa. Ao contrário das proteínas Cry, Cyt não se liga a receptores específicos da membrana celular,

e sim, diretamente aos lipídios da membrana. Após sua ligação, as proteínas Cyt induzem a formação de poros ou agem desestruturando a bicamada lipídica das membranas (BRAVO et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado ocorrer um efeito sinérgico entre as proteínas Cry e entre estas e as proteínas Cyt, ou seja, a maior toxicidade é devida à interação das proteínas, onde uma potencializa o efeito da outra. (BRAVO et al., 2007; ÖSKAN, 2003).

2.5 OUTRAS TOXINAS PRODUZIDAS POR *B. thuringiensis*

Além das proteínas Cry e Cyt, *B. thuringiensis* sintetiza outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica.

Em 1967 Heimpel sugeriu o nome de β -exotoxina para uma substância termoestável e tóxica para alguns insetos. Devido a sua estrutura química, o nome β -exotoxina vem sendo substituído por thuringiensina. Essas proteínas possuem baixo peso molecular, a sua toxicidade relaciona-se a inibição da RNA polimerase, pois é análoga a nucleotídeos. Embora não possua especificidade, a ação da thuringiensina contribui para a toxicidade global das linhagens que a expressam (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; HABIB; ANDRADE, 1998; LERECLUS et al., 1993). Alguns trabalhos citam a importância dessa toxina no controle de besouros e algumas espécies de ácaros (WU et al., 2002). No entanto, as linhagens comerciais de *B. thuringiensis* não devem produzir esta toxina, pois ela poderia ocasionar efeitos adversos em organismos não alvos.

Muitos sorotipos de *B. thuringiensis* produzem proteínas denominadas Vip (vegetative insecticidal proteins), as quais são sintetizadas na etapa vegetativa do crescimento. Apesar de não integrarem o cristal protéico, estas proteínas são tóxicas a insetos e possuem forma de intoxicação similar às das proteínas Cry, o que as fazem candidatas potenciais para o controle biológico (CRICKMORE et al., 2008; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Em 2000, Mizuki et al. descreveram uma nova toxina de *B. thuringiensis* a qual passou a ser denominada Parasporina. Estas toxinas são definidas como proteínas paraesporal de *B. thuringiensis* sem atividade hemolítica e que apresentam a capacidade de atacar células cancerígenas em geral (OHBA et al., 2008).

Bacillus thuringiensis sintetiza fosfolipases C, estas são produzidas ao final da fase exponencial de crescimento e são excretadas para o meio de cultura (AGAISSE et al.,

1995). Essa bactéria sintetiza também quitinases e proteases que contribuem para romper a membrana peritrófica presente no intestino dos insetos, contribuindo, dessa maneira, para a toxicidade das linhagens (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Além das toxinas, o esporo de *B. thuringiensis* também contribui para sua toxicidade, pois estes podem germinar no interior do inseto-alvo já debilitado, ocasionando septicemia; ou potencializar o efeito da toxina em uma ação sinérgica, com mecanismo ainda desconhecido (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; RAYMOND et al., 2008).

2.6 PRODUÇÃO DE *B. thuringiensis*

As primeiras indústrias a demonstrarem interesse no estudo e comercialização de *B. thuringiensis* foram empresas de fermentação. Logo as indústrias de produtos químicos perceberam a importância deste mercado de controle biológico e se lançaram em sua pesquisa e produção (CABALBO; MORAES, 1988).

Nas décadas de 1970 e 1980, com o isolamento de novas linhagens e a possibilidade da manipulação gênica, o interesse por *B. thuringiensis* aumentou bastante, principalmente no setor privado (ARANTES et al., 2002; CAPALBO et al., 2004).

No Brasil, estudos realizados por diversos grupos em diferentes regiões têm tentado implantar centros biotecnológicos para a produção de produtos à base de *B. thuringiensis*. Atualmente, tais centros estão em fase de estabelecimento dos métodos de produção e execução dos testes preliminares. Como exemplos destes centros podem-se citar a Probiom Tecnologia, situada na cidade de Campinas (São Paulo) e Bioticom, situada em Recife (Pernambuco). A empresa Bthek Biotecnologia Ltda., com sede em Brasília, foi uma das primeiras a formular e comercializar um produto nacional à base de *B. thuringiensis*.

Em geral, os produtos à base de *B. thuringiensis* são compostos por uma mistura de cristais, esporos, poucas células vegetativas e ingredientes secundários da formulação (CAPALBO et al., 2004). Muitos destes produtos não são acessíveis aos consumidores, quer pelo preço, pela falta de informação ou devido às condições legais estabelecidas pelo país. O desenvolvimento de produções locais pode ser uma solução para tal situação. Neste caso, a produção pode ser feita em um volume menor, escala piloto, utilizando-se materiais alternativos e abundantes na região a ser atendida (SALAMA; MARGALIT, 1993; MORRIS et al., 1997).

Em geral, a produção de *B. thuringiensis*, assim como de outros produtos microbianos, envolve as seguintes etapas: seleção da linhagem, estocagem, processo fermentativo, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto e análise da qualidade (MORAES *et al.*, 2001 COUCH, 2000).

Segundo Couch (2000) os principais critérios para seleção de uma subespécie bacteriana para produção de bioinseticidas são: espectro de ação, potência por unidade de volume da cultura, requerimentos nutricionais, facilidade de produção, estabilidade genética e facilidade de estocagem.

A estocagem apropriada é de grande importância, pois a linhagem deve conservar seu potencial tóxico e velocidade de crescimento. No caso de *B. thuringiensis*, as trocas de plasmídios ocorrem com certa frequência e há relatos de perda de toxicidade após sucessivas fermentações, sendo essencial a constante busca por novas linhagens e o monitoramento durante o processo de fermentação (COUCH, 2000; BIZARRI *et al.*, 2008).

A forma mais comum de produção de *B. thuringiensis* é por fermentação submersa (líquida) descontínua, também conhecida como processo em batelada. Nesta fermentação, um recipiente contendo meio de cultura líquido é inoculado com o microrganismo, não havendo acréscimo ou retirada significativa do meio fermentado. Portanto, ocorre todo o desenvolvimento da cultura, sendo retirado o produto apenas no final do processo. Em geral, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* são formadas no fim da fermentação, quando as condições do meio se tornam desfavoráveis, sendo o processo em batelada satisfatório para tal produção (MORAES *et al.*, 2001).

Alguns pesquisadores têm estudando as fermentações sólida, contínua e em batelada alimentada, porém até o momento, o mais viável para produção de proteínas Cry ainda é o processo em batelada submersa (ADAMS *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003, MORAES *et al.*, 2001, VALLEJO *et al.*, 1999).

Na fermentação industrial os passos a serem seguidos são: pré inóculo, geralmente feito em frascos pequenos, pré fermentador, comumente com 1/5 do volume da fermentação e o fermentador final. Durante todas as etapas deve-se analisar a cultura quanto à contaminação, características morfológicas e potencial entomopatogênico. Em geral, os reatores utilizados permitem o controle das condições principais de cultivo, as quais são: temperatura, pH, aeração e agitação. O pré-inóculo, pré-fermentador e o fermentador em volumes crescentes são feitos a fim de diminuir o tempo da fase *lag*, ou seja, o período de adaptação do microrganismo às condições de cultivo. Em geral, pré fermentadores e fermentador possuem os mesmos ingredientes no meio de cultivo. É importante limitar a

quantidade de passos no processo de produção a fim de evitar contaminações e mudanças indesejáveis no comportamento da bactéria (COUCH, 2000; MORAES *et al.*, 2001).

Ao final da fermentação, a cultura de *B. thuringiensis* apresenta em média 6 a 8% de sólidos, sendo que os cristais e esporos correspondem a cerca da metade dessa porcentagem. Há vários métodos que podem ser utilizados para a recuperação destes cristais e esporos, sendo o mais comum a centrifugação e a micro-filtração. É importante ressaltar que tais processos permitem a recuperação principalmente das proteínas Cry; muitas outras toxinas que podem contribuir para a toxicidade final do produto são perdidas. Atualmente novas técnicas de recuperação e/ou concentração do produto estão sendo desenvolvidas para complementar as mais utilizadas, destacando-se: a liofilização e a flotação (BRAR *et al.*, 2006; COUCH, 2000).

Após a recuperação dos metabolitos de interesse, os produtos são formulados. No caso dos bioinseticidas, a formulação tem três objetivos principais: conferir estabilidade ao produto durante a estocagem e aplicação, facilitar a aplicação do produto e proteger o microrganismo das condições adversas do ambiente. Há dois tipos básicos de formulação: sólida e líquida. Em geral, as formulações sólidas são mais estáveis e preferíveis (BRAR *et al.*, 2006; COUCH, 2000).

Embora sejam segredos industriais, os produtos formulados geralmente contam com uma combinação de aditivos reconhecidos pela FDA (*Food and Drug Administration*) ou pelo órgão competente do país. É comum o uso de dispersantes, protetores e surfactantes (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BRAR *et al.*, 2006).

Antes de ser comercializado, o produto formulado deve passar por testes de análise de qualidade que atestem principalmente sua potência tóxica. Para *B. thuringiensis*, a toxicidade é geralmente analisada por meio de bioensaio com o inseto-alvo (COUCH, 2000).

Além dos testes de toxicidade, os bioinseticidas comercializados devem passar por uma série de testes que assegurem sua segurança ambiental e à saúde humana. Em geral, são feitos testes com mamíferos sadios e imune-suprimidos, os quais são submetidos à exposição dérmica, ocular, inoculação intraperitoneal e subcutânea. Em relação à inocuidade ambiental, são feitos testes para avaliar a toxicidade dos produtos sobre aves, vertebrados aquáticos, invertebrados, incluindo insetos não-alvo, vegetais e até mel de abelhas. Estes ensaios de toxicidade não devem indicar efeitos adversos significativos nos organismos testados, o que garante a segurança ambiental dos produtos (VILAS-BÔAS *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, esses testes são regulamentados pela Agência de Proteção Ambiental (US-EPA) e departamento de agricultura dos estados, os quais exigem uma licença para que o

produto seja comercializado. No Brasil, essa licença é expedida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a qual também exige testes padrões para liberação da comercialização do produto.

2.7 MEIOS DE CULTURA

A escolha do meio de cultivo adequado é extremamente importante para o sucesso de um produto. Esta escolha deve atender a dois requisitos principais; proporcionar uma boa produção e não ser muito oneroso (COUCH, 2000).

Os meios de cultivo para *B. thuringiensis* geralmente possuem uma fonte de nitrogênio, outra de carbono e sais minerais. Algumas vezes se adicionam ao meio alguns tampões e anti-espumantes a fim de facilitar o processo (COUCH, 2000).

A fonte de carbono, além de fornecer matéria-prima para muitos compostos celulares, serve como fonte de energia. O nitrogênio é requerido principalmente para síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Os sais minerais atuam como co-fatores, sendo também importantes no controle da osmolaridade celular.

Couch (2000) cita os principais componentes e suas concentrações utilizadas no cultivo de *B. thuringiensis* na América do Norte (Tabela 2.1). Apesar das indústrias não revelarem a composição de seus meios, sabe-se que estes geralmente são combinação dos produtos listados. Muitos dos produtos utilizados são componentes indefinidos, porém não devem apresentar muita variação de um lote para outro.

Meios alternativos vêm sendo estudados a fim de baratear o produto final, principalmente nas produções regionais e em escala piloto. Poopathi et al. (2002) obtiveram resultados expressivos em cultivos em meio à base de batata. Vora e Shethna (1999) estudaram um meio contendo extrato de soja suplementado com cistina, tendo bons resultados para produção de δ -endotoxina. Prabakaran et al. (2008) desenvolveram um meio de cultivo a base de água de coco, obtendo resultados satisfatórios para produção de toxinas. No Brasil, a possibilidade de se utilizar meios alternativos apresenta um amplo potencial tendo em vista a diversidade natural e variabilidade da agroindústria.

Vários estudos têm sido feitos utilizando-se como meio de cultivo para *B. thuringiensis* águas residuais de indústrias e de estações de tratamento de água, tais trabalhos têm apresentado bons resultados, e muitas produções em escala piloto já utilizam tais resíduos

(LACHHAB et al., 2002; MONTIEL et al., 2001; VIDYARTHI et al., 2002; YEZZA et al., 2005, 2006; CHANG et al, 2008).

A fonte de carbono para cultivo de *B. thuringiensis* varia muito conforme o objetivo da fermentação, bem como qual linhagem está sendo cultivada. A maioria dos trabalhos revela que a melhor fonte para crescimento vegetativo não corresponde à melhor fonte para esporulação e formação dos cristais protéicos (IÇGEN et al., 2002b; ÖSKAN et al, 2003).

Os estudos de Içgen et al. (2002b) indicam um efeito inibidor da glicose durante a síntese da δ -endotoxina. De acordo com este trabalho, as melhores fontes de carbono para produção dos cristais tóxicos e esporulação são lactose, sacarose e inulina.

Segundo de Öskan et al. (2003), a glicose, amido e melaço inibem a produção de toxina, em particular a proteína Cry4B (134KDa). Este estudo foi feito com *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e ressalta o efeito repressor da glicose, a qual agiria em etapas de fosforilação da proteína quinase Calfoquina C, responsável pela produção das protoxinas Cry. Segundo os autores, as melhores fontes de carbono para biossíntese da δ -endotoxina seriam dextrina, aveia, maltose, lactose, inulina, glicerol e sacarose, sendo a dextrina a mais promissora de todas quanto à esporulação e produção de toxina.

Resultados diferentes dos pesquisadores Öskan et al. (2003) estão presentes nos trabalhos de Vora e Shethna (1999) e Prabakaran et al. (2004), os quais indicam o melaço-de--cana como uma boa fonte de carbono para produção de toxina. Estes estudos comprovam que é necessário otimizar um meio para cada sorotipo, pois os resultados do estudo com um determinado sorotipo muitas vezes não podem ser extrapolados para outros.

Tabela 2.1 – Principais ingredientes utilizados em meios de cultivo de bactérias entomopatogênicas e suas concentrações.

Ingrediente	Concentração (g/L)
Farinha de soja	20-40
Farinha da semente do algodão	14-30
Proteína de batata	15-40
Licor de milho ou sólidos derivados de milho	15-30
Glicose	10-30
Peptona	2-5
Xarope de milho	20-45
Melaço	1,0-18,6
Glicerol	2,0-10
Amido de milho	10-15
Extrato de levedura	2,0
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	1,0
FeSO_4	0,02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0005-0,02
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005
CaCO_3	1,0-1,5
PPG2000 (tampão)	2,0-5,0
Anti-espumante Hodag FD62	3,0
Anti-espumante SAG 5693	0,5-1,25
Anti-espumante Dow Corning	0,1

Fonte: Couch, 2000

As fontes de nitrogênio podem ser tanto orgânicas quanto inorgânicas, sendo comum a utilização das duas fontes juntas. Os estudos de Arcas *et al.* (1984), Içgen *et al.* (2002b), Öskan *et al.* (2003) e Zouari e Jaoua (1999) indicam que o uso de apenas nitrogênio inorgânico não é aconselhável para o cultivo de *B. thuringiensis*, pois há diminuição de crescimento, esporulação e biossíntese quando comparado aos meios com fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. Dentre as mais promissoras fontes de nitrogênio inorgânico apontadas por estes autores, destacam-se os fosfatos [$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$] e sulfato de amônia por otimizarem esporulação e, muitas vezes, a produção de toxinas. Entre as fontes orgânicas, o extrato de levedura é bastante utilizado no cultivo de *B. thuringiensis*, porém peptona e derivados de soja apresentam resultados promissores (VORA; SHETNA, 1999; IÇGEN *et al.*, 2002b; MORRIS *et al.*, 1997)

Como fontes alternativas de nitrogênio orgânico vêm se destacando: farinhas derivadas de proteína animal (farinha de peixe e de crisálida) e alguns cereais (cevada e trigo) (ALVES *et al.*, 1997; DEVI, 2005; GHRIBI *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 1997, PRABAKARAN; BALAMARAN, 2006; ZOUARI; JAOUA, 1999).

A concentração de sais no meio de cultivo influencia diretamente a osmolaridade do mesmo. Entretanto, não há consenso sobre qual porcentagem de sais é mais adequada, bem como quais os sais que devem ser adicionados (ARCAS *et al.*, 1987; IÇGEN *et al.*, 2002a; ÖSKAN *et al.*, 2003).

Arcas *et al.* (1987) obtiveram uma boa produção de toxina com um meio contendo osmolaridade de 808 miliosmol, tal relato é experimento clássico que resultou em um meio bastante adotado para crescimento e produção de *B. thuringiensis*. É importante ressaltar que embora os sais ajam como um todo na osmolaridade, cada íon fornecido pelos sais pode ter um efeito diferente. Muitas vezes, produção e crescimento não estão associados e a presença de alguns íons melhora um parâmetro e prejudica ou é neutra para outro.

Os estudos de Öskan *et al.* (2003) e Içgen *et al.* (2002a) revelaram que o manganês é crítico para a diferenciação celular, sendo requerido para esporulação e formação do cristal de toxina. Provavelmente este íon atue em processos de co-regulação da síntese da toxina. Os melhores resultados aparecem quando a concentração de manganês varia entre 10^{-6} e 10^{-4}M , valores maiores que estes se tornam tóxicos para todos os processos celulares.

Assim como manganês, o magnésio influencia o metabolismo secundário, portanto, com efeito na produção das proteínas Cry. Sua concentração ideal é em torno de 10^{-3}M . O cálcio é bastante importante no processo de esporulação, promovendo a estabilidade do cristal protéico. A concentração de 10^{-3}M de cálcio estimula a esporulação, porém é inibidora

para o crescimento vegetativo e síntese protéica. Ao que parece, o cálcio não é essencial para a síntese das proteínas Cry. Recomenda-se o uso de concentrações menores que 10^{-3} M de cálcio, a fim de não comprometer a formação das proteínas Cry (IÇGEN *et al.*, 2002a; ÖSKAN *et al.*, 2003).

Metais como zinco, cobre e ferro apresentam resultados negativos para o crescimento, esporulação e produção de toxina Cry mesmo em concentrações pequenas como 10^{-7} M (IÇGEN *et al.*, 2002a; ÖSKAN *et al.*, 2003).

2.8 BIOENSAIO

Um dos parâmetros mais importantes no estudo com *B. thuringiensis* é o seu potencial tóxico ante o inseto-alvo. Embora muitos estudos utilizem a quantificação de proteínas Cry para aferir a toxicidade de uma produção, sabe-se que o bioensaio é um método mais sensível, pois fornece indícios não só quantitativos, mas também da eficácia da toxicidade da produção. Liu e Tzeng (1998) indicam em seu trabalho a utilização do bioensaio na otimização de produções, pois apenas contagem de esporos ou quantificação de proteínas não foram suficientes.

O bioensaio pode ser entendido como um teste onde seres vivos são expostos a uma determinada substância, sob condições controladas. No caso de *B. thuringiensis*, o bioensaio é feito com larvas de insetos alvos segundo protocolos da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MORAES, *et al.*, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Para *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, o teste é feito com larvas de dípteras dos Gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, entre outros. Nesse ensaio, larvas entre terceiro ou quarto instar são colocadas em diferentes recipientes, nos quais são aplicadas diferentes concentrações do produto. O experimento é mantido a 25-28 °C por um período de 24 horas, quando então são mensuradas as quantidades de larvas mortas em cada uma das concentrações. Faz-se então um cálculo da concentração letal para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas por meio de uma regressão linear log-probit, a qual pode ser feita com o uso de programas de computador adequados. O bioensaio é feito em triplicata e há um controle negativo, no qual não é aplicado o produto. Em alguns casos, como por exemplo, no estudo de novas linhagens, padroniza-se uma concentração para as diferentes linhagens, aplica-se a

cultura e, posteriormente, realiza-se o bioensaio completo. Esse teste incompleto tem como objetivo fazer uma triagem inicial de novas linhagens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O bioensaio pode ser expresso também em termos de Unidades Internacionais (ITU), nesse caso, a CL_{50} do produto em teste é comparada com o bioensaio de uma cepa de padrão internacional a qual foi atribuída um valor arbitrário de potência. Para *B. thuringiensis israelensis*, a cepa padrão é a IPS82, cuja potência contra *A. aegypti* é de 15000 ITU/mg (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Muitos fatores podem influenciar um bioensaio, destacando-se a espécie de inseto, o instar, a densidade de larvas, qualidade da água e a temperatura, desse modo é crucial a padronização do teste. Estudos revelam que *A. aegypti* é uma das espécies mais sensíveis à *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, isto ocorre devido a fatores intrínsecos dessa espécie, tais como sua alta velocidade de filtração da água (JARIC'-PERKUSIC *et al.*, 2008; OTIENO-AYAYO *et al.*, 2008).

2.9 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E USO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Os processos fermentativos são influenciados por muitas variáveis, que podem interagir entre si. O estudo da influência das variáveis bem como da suas interações sob um determinado resultado é muito difícil de ser realizado sem um planejamento experimental adequado. Desta maneira, o planejamento experimental tem por objetivo principal “projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos” (BARROS NETO *et al.*, 1995).

O planejamento adequado permite executar o experimento de maneira mais organizada e com um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário para se alcançar os objetivos de interesse. Além disso, com o planejamento experimental é possível calcular o erro experimental e até mesmo otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Até o início da década de 1970, os estudos sobre meios de cultivo para microrganismos eram feitos modificando-se uma variável a cada ensaio. Embora tenha sido bastante comum, este método não permite o estudo das interações entre as variáveis, além de muitas vezes exigir uma grande quantidade de ensaios, tornando-se dispendioso. No início

dos anos de 1970, os trabalhos dos pesquisadores Fisher e Box sobre desenho experimental se popularizaram. De acordo com a proposta destes trabalhos, mais de uma variável muda durante um ensaio, possibilitando estudar as interações entre uma variável e outra, além de facilitar a modelagem matemática do processo (KENNEDY; KROUSE, 1999; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Entre os métodos mais comuns de planejamento experimental destacam-se o planejamento fatorial. Nessa metodologia, há combinação entre os valores de duas ou mais variáveis. Esses valores são definidos a “priori” segundo os interesses do pesquisador, com base em dados da literatura ou análises empíricas.

O planejamento fatorial pode ser completo ou incompleto, ele é dito completo quando todas as combinações entre as variáveis nos seus diferentes valores são executadas em ensaios. Já no planejamento fatorial incompleto, também chamado de fracionado, apenas um número limitado das possíveis combinações das variáveis é realizado em ensaios (KENNEDY; KROUSE, 1999; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Geralmente, o planejamento fracionado é utilizado quando a quantidade de variáveis e valores é muito grande e a execução de todas as combinações se torna inviável, neste caso o planejamento fracionado serve para fazer uma triagem de quais variáveis são importantes para o processo e devem continuar no estudo. O planejamento fatorial completo geralmente é feito em uma segunda etapa, quando as variáveis importantes já foram selecionadas e, posteriormente se deseja estudar seus valores e interações com mais detalhes (KENNEDY; KROUSE, 1999).

Denomina-se nível os valores que cada variável será estudada, no caso de se estudar 5 variáveis em 2 níveis cada, resultarão em 32 ensaios em um planejamento experimental completo. Neste exemplo, o planejamento é dito 2^5 , sendo o expoente a quantidade de variáveis e o número elevado a quantidade de níveis de cada variável. Caso em uma etapa do experimento realize-se apenas 16 ensaios dos 32 possíveis, o desenho passa a ser um fatorial incompleto 2^{5-1} .

Tendo-se feito um planejamento experimental adequado, podem-se aplicar técnicas que permitam o estudo da otimização do processo. Entre as técnicas estatísticas de otimização mais utilizadas destaca-se a superfície de resposta.

“A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de respostas, é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro” (BOX et al, 1978 apud RODRIGUES; IEMMA, 2005). Esta técnica foi desenvolvida por Box

e Wilson no início da década de 1950 e consiste em duas etapas principais que devem ser repetidas quantas vezes forem necessárias a fim de se alcançar um ótimo. A primeira etapa é a de modelagem e geralmente é feita ajustando-se os modelos matemáticos aos dados experimentais obtidos por meio de um planejamento fatorial adequado. A segunda etapa consiste em um deslocamento geralmente no sentido de máxima inclinação do modelo matemático (BARROS NETO et al., 1995). Em geral, nesta técnica a resposta é representada em gráficos de superfícies que permitem visualizar melhor os resultados contribuindo para sua interpretação (KENNEDY; KROUSE, 1999).

Alguns trabalhos já foram realizados com *B. thuringiensis* utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. Entre estes trabalhos destaca-se Prabakaran et al. (2004) que estudaram o melhoramento de um meio a base de ingredientes alternativos para a produção de toxina por uma subespécie de *B. thuringiensis*. Tokcaer et al. (2006) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições de cultivo para produção de proteínas Cry por *B. thuringiensis*. Ambos os trabalhos conseguiram melhorar a produção de toxinas pelas subespécies estudadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar um meio de cultivo para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537, por fermentação submersa descontínua, utilizando resíduos agroindustriais, com intuito de controlar populações de *Aedes aegypti*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a melhor fonte de nitrogênio entre: farinha de soja, farinha de crisálida, peptona bacteriológica, uréia agroindustrial e sulfato de amônia para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537, utilizando desenho experimental e análises estatísticas adequadas.

Determinar a melhor fonte de carbono entre: sacarose, glicose e fécula de mandioca para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537, utilizando desenho experimental e análises estatísticas adequadas.

Determinar as melhores concentrações de fontes de nutrientes selecionadas para produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537, utilizando a metodologia de análise de superfície de resposta.

Estudar a cinética de crescimento associada à produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537.

Verificar a toxicidade da cultura de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537 por um período de 28 dias após sua fermentação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste estudo foi *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, HD537, que foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioinseticida do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina.

4.2 RECUPERAÇÃO E MANUTENÇÃO DA CULTURA

A linhagem *B. thuringiensis israelensis* HD537 foi inicialmente recuperada a partir de cultura estoque em água e fitas de papel filtro. Essa recuperação foi feita em frascos Enlermeyer de 500mL, contendo 50mL de meio Arcas adaptado (ANDRADE, 2005), o qual continha (g/L): MgSO₄ (1,0); KH₂PO₄, (1,0); K₂HPO₄ (1,0); MnSO₄.H₂O (0,3); CaCl₂ (0,4); (NH₄)₂SO₄ (1,0), extrato de levedura (8,0) e glicose (4,5). Os frascos foram mantidos a 30 °C, 120rpm, por um período de 16 horas.

Após a recuperação, a linhagem foi cultivada em meio Agar nutriente por 24 horas a 30 °C e, posteriormente, mantida sob refrigeração. Essa cultura foi replicada quinzenalmente.

4.3 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

Antes do preparo do pré-inóculo, *B. thuringiensis israelensis* HD537 foi cultivado em meio Arcas adaptado (ANDRADE, 2005), a fim de melhorar e sincronizar o crescimento do microrganismo em meio líquido. Nessa etapa, a cultura foi mantida a 30 °C e 120rpm (agitador rotativo) durante 16 horas em frascos tipo Erlenmeyer com 500mL de capacidade, contendo 50ml de meio. Então, o pré-inóculo foi feito transferindo-se 1,25mL da cultura em meio Arcas adaptado para um Erlenmeyer de 500mL de capacidade, contendo

50mL do meio a ser testado. O pré-inóculo foi mantido a 30 °C, 120rpm (agitador rotativo) por um período de 16 horas.

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os meios de cultivo a serem estudados foram preparados e esterilizados em frascos Erlenmeyer de 500mL de capacidade, contendo 50mL de meio. Cada cultura recebeu 1,25mL do pré-inóculo e foi mantida a 30 °C e 120rpm em agitador rotativo, por um período de 72 ou 96 horas. O tempo de cultivo variou conforme o objetivo da etapa do estudo e foi baseado em testes preliminares e também em dados da literatura (ANDRADE, 2005; COUCH, 2000).

4.5 SELEÇÃO DAS FONTES DE NUTRIENTES

As fontes de nutriente estudadas bem como seus níveis iniciais foram escolhidos de acordo com testes preliminares e dados da literatura. Como fontes de nitrogênio orgânico foram estudadas:

- Farinha de soja: escolhida por ser utilizada na produção do Laboratório de Bioinseticida, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina;
- Farinha de crisálida: esse ingrediente foi gentilmente cedido pela indústria de fiação de seda Bratac S.A.. O processo de obtenção dessa farinha pela indústria citada encontra-se descrito no Anexo 1. Esse ingrediente foi escolhido para o estudo com base em testes preliminares e dados da literatura (ALVES *et al.*, 1997);
- Peptona bacteriológica: escolhida por ser ingrediente comum no cultivo industrial de bactérias entomopatogênicas (COUCH, 2000);
- Uréia agroindustrial: escolhida por ser comumente utilizada na agricultura como fonte de nitrogênio e por apresentar um baixo custo.

Como fonte de nitrogênio inorgânico foi utilizado o sulfato de amônia $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, o qual compõe o meio Arcas, comumente utilizado na fermentação de *B. thuringiensis* (ARCAS, 1987).

As fontes de carbono estudadas foram:

- Glicose: escolhida por ser comumente empregada no cultivo de *B. thuringiensis* (ARCAS, 1987);
- Sacarose: escolhida com base em estudos de Içgen *et al.* (2002b) e Öskan *et al.* (2003);
- Fécula de mandioca: escolhida por apresentar um baixo custo e como uma alternativa ao uso de amido de milho, o qual é empregado em várias produções de bactérias entomopatogênicas (COUCH, 2000).

A seleção das fontes foi feita por meio de um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} (resolução IV), no qual cada variável foi estudada em dois níveis (-1 e +1) com variações extremas. Esses experimentos foram feitos em dois blocos aleatórios. O objetivo desta etapa foi criar um contraste entre os níveis e, com isto realizar uma seleção qualitativa. O planejamento fatorial dessa etapa encontra-se na Tabela 4.1.

Além das fontes de nutrientes em estudo, o meio de cultivo continha uma mistura de sais baseada no meio Arcas adaptado (ANDRADE, 2005), a qual não sofreu alteração e não foi foco de estudo durante toda a pesquisa. Os sais presentes nessa mistura foram (g/L): MgSO_4 (1,0); KH_2PO_4 , (1,0); K_2HPO_4 (1,0); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,3) e CaCl_2 (0,4).

As condições dos experimentos dessa etapa foram as mesmas descritas nos itens 4.3 e 4.4 por um período de 72 horas.

Os resultados de bioensaios contra larvas de *Ae. aegypti* foram utilizados para a seleção das fontes, conforme descrito no item 4.9.1. Além dessa resposta, foi analisado o efeito das fontes de nutrientes em estudo sobre o crescimento e esporulação; para isso, foram feitas contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e Contagem de esporos, como descritos no itens 4.9.2 e 4.9.3 respectivamente.

Tabela 4.1 – Planejamento experimental utilizado na etapa de seleção das fontes de nutrientes. Os números (+1) e (-1) indicam, respectivamente, os níveis máximos e mínimos de cada variável. Os valores entre parênteses correspondem aos valores reais das variáveis em g/L.

Experimento	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Fécula de mandioca (g/L)	Farinha de soja (g/L)	Farinha de crisálida (g/L)	Peptona de carne (g/L)	Uréia (g/L)	Sulfato de amônia (g/L)
1	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	-1 (0,2)
2	1 (10)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	1 (5,0)	1 (20)	1 (20)
3	-1 (1,0)	1 (10)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,5)	1 (20)	1 (20)
4	1 (10)	1 (10)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	1 (20)	1 (5,0)	-1 (0,2)	-1 (0,2)
5	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1 (15)	-1 (5,0)	1 (20)	1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,2)
6	1 (10)	-1 (1,0)	1 (15)	-1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	1 (20)
7	-1 (1,0)	1 (10)	1 (15)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	1 (5,0)	-1 (0,2)	1 (20)
8	1 (10)	1 (10)	1 (15)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	1 (20)	-1 (0,2)
9	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	1 (5,0)	1 (20)	1 (5,0)	-1 (0,2)	1 (20)
10	1 (10)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	1 (50)	1 (20)	-1 (0,5)	1 (20)	-1 (0,2)
11	-1 (1,0)	1 (10)	-1 (1,5)	1 (50)	-1 (2,0)	1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,2)
12	1 (10)	1 (10)	-1 (1,5)	1 (50)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	1 (20)
13	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1 (15)	1 (50)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	1 (20)	1 (20)
14	1 (10)	-1 (1,0)	1 (15)	1 (50)	-1 (2,0)	1 (5,0)	-1 (0,2)	-1 (0,2)
15	-1 (1,0)	1 (10)	1 (15)	1 (50)	1 (20)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	-1 (0,2)
16	1 (10)	1 (10)	1 (15)	1 (50)	1 (20)	1 (5,0)	1 (20)	1 (20)

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE NUTRIENTES SELECIONADAS

Essa etapa teve por objetivo otimizar a concentração das fontes de nutrientes selecionadas como descrito no item 4.5. Inicialmente foram feitos dois planejamentos fatoriais incompletos 2^{3-1} , onde os níveis das variáveis foram selecionados segundo dados da literatura. Esses planejamentos fatoriais foram feitos em apenas um bloco com nove experimentos, como descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Planejamento fatorial fracionado 2^{3-1} (resolução IV)

Experimentos	Glicose	Sulfato de amônia	Farinha de crisálida
1	-1	-1	-1
2	-1	0	1
3	-1	1	0
4	0	-1	1
5	0	0	0
6	0	1	-1
7	1	-1	0
8	1	0	-1
9	1	1	1

Os níveis das variáveis no primeiro e no segundo planejamento fatorial incompleto encontram-se descritos nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente. Esses níveis foram codificados de acordo com a equação abaixo:

$$X_{\text{codificado}} = \frac{X_i - X_0}{\Delta X / 2}$$

Onde:

$X_{\text{codificado}}$: nível codificado da variável

X_i = valor real

X_0 = valor no ponto central

ΔX = valor real máximo – valor real mínimo

Tabela 4.3 – Níveis das variáveis no primeiro planejamento fatorial incompleto da etapa de otimização das fontes de nutrientes

Variáveis	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Glicose (g/L)	2,0	6,0	10,0
Sulfato de amônia (g/L)	2,0	4,0	6,0
Farinha de Crisálida (g/L)	10,0	30,0	50,0

Tabela 4.4 – Níveis das variáveis no segundo planejamento fatorial incompleto da etapa de otimização das fontes de nutrientes

Variáveis	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Glicose (g/L)	0,5	1,25	2,0
Sulfato de amônia (g/L)	1,0	3,0	5,0
Farinha de Crisálida (g/L)	50,0	90,0	130,0

Após o segundo planejamento fatorial incompleto, foram feitos 4 experimentos com valores para as variáveis próximos ao do experimento com melhor resultado de bioensaio obtido até então. Com isto, determinou-se o ponto central para o próximo planejamento. Com base nesses resultados, foi feito um fatorial completo central rotacional (2^3), com uma repetição no ponto central, além dos pontos axiais (“pontos estrelas”). Os níveis das variáveis utilizados nesse planejamento fatorial completo encontram-se na Tabela 4.5. Os 16 experimentos desse planejamento fatorial completo central rotacional foram feitos em dois blocos, como descrito na Tabela 4.6.

Tabela 4.5 – Níveis das variáveis no planejamento fatorial completo (2^3) com repetição no ponto central e pontos estrelas

Variáveis	Nível (-1,79)	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)	Nível (+1,79)
Glicose (g/L)	0,005	0,25	0,5	0,75	0,95
Sulfato de amônia (g/L)	0,10	0,5	1,0	1,5	1,90
Farinha de Crisálida (g/L)	32,11	40,0	50,0	60,0	67,89

As condições de cultivo dessa etapa de otimização foram as mesmas descritas no item 4.3. Em todos os experimentos o cultivo durou 72 horas.

Tabela 4.6 – Planejamento fatorial completo 2^3 com repetição no ponto central (experimentos 9 e 10) e pontos estrelas (experimentos 11 a 16)

Experimentos	Blocos	Glicose	Sulfato de Amônia	Farinha de. crisálida
1	1	-1,00000	-1,00000	-1,00000
2	1	-1,00000	-1,00000	1,00000
3	1	-1,00000	1,00000	-1,00000
4	1	-1,00000	1,00000	1,00000
5	1	1,00000	-1,00000	-1,00000
6	1	1,00000	-1,00000	1,00000
7	1	1,00000	1,00000	-1,00000
8	1	1,00000	1,00000	1,00000
9 (C)	1	0,00000	0,00000	0,00000
10 (C)	1	0,00000	0,00000	0,00000
11	2	-1,78885	0,00000	0,00000
12	2	1,78885	0,00000	0,00000
13	2	0,00000	-1,78885	0,00000
14	2	0,00000	1,78885	0,00000
15	2	0,00000	0,00000	-1,78885
16	2	0,00000	0,00000	1,78885

Os dados de bioensaio foram utilizados para a otimização da concentração das fontes de carbono, nitrogênio orgânico e inorgânico, como descrito no item 4.9.1. Além dessa resposta, estudou-se também o crescimento (UFC/mL) e esporulação, como descrito nos itens 4.9.2 e 4.9.3, respectivamente.

4.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE TOXINAS

Após a otimização das fontes de nutrientes, foi feito um estudo a fim de se verificar a curva de crescimento de *B. thuringiensis israelensis* HD537 no meio obtido, bem como em qual das etapas de crescimento ocorre a maior produção de toxinas. Para tanto, foram inoculadas culturas com o meio de cultivo com as fontes otimizadas e mantidas como descrito no item 4.3. Essas culturas foram mantidas por um período de 96 horas.

Em intervalos predeterminados, foram retiradas alíquotas das culturas a fim de se analisar seu crescimento, produção de toxinas e pH. Nessa etapa, o crescimento foi avaliado por meio de gravimetria e turbidimetria, como descrito nos itens 4.9.4 e 4.9.5

respectivamente. A produção de toxinas foi avaliada por meio de bioensaio, como descrito no item 4.9.1. O pH foi medido por meio de um potenciômetro modelo Tec-3MP (Tecnal). Foram feitas ainda, lâminas para análise microscópica, como descrito no item 4.9.6.

Esse experimento foi repetido por três vezes, sendo que todos os métodos de análise de crescimento e medição de pH foram feitos em duplicata e o bioensaio foi feito em triplicata.

4.8 TOXICIDADE DA CULTURA DE *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* PÓS-FERMENTAÇÃO

A toxicidade da cultura de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* HD537, contendo seus metabólitos, foi estudada por um período de 28 dias. Para isso, foram feitas quatro culturas com o meio otimizado, as quais foram fermentadas sob as condições do item 4.3 por um período de 72 horas.

Após o cultivo, duas culturas foram mantidas sob refrigeração em câmara fria a 5 °C (+/-2 °C) e duas foram mantidas sob condições ambientais (sem controle de temperatura), porém ao abrigo da luz. A cada sete dias foram realizados bioensaios com cálculo da CL₅₀ para essas culturas.

4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1 Bioensaio

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica, coordenado pelo professor Dr. José Lopes, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Estes testes foram feitos com base na metodologia da WHO 2005, com larvas entre terceiro e quarto instar de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762).

Nas etapas de seleção de fontes, otimização do meio de cultivo e pontos iniciais do estudo da cinética, foram feitos bioensaios com uma única concentração definida a priori. Nessas etapas, os resultados foram expressos em porcentagem de larvas mortas na

concentração testada. Na seleção das fontes a concentração final nos recipientes de bioensaio foi de 10ppm (v/v), já na otimização das fontes e pontos do estudo da cinética essa concentração foi de 1,0ppm (v/v).

No estudo da toxicidade pós-fermentação e nos últimos pontos da etapa de estudo da cinética, foram feitos bioensaios com seis concentrações diferentes e calculou-se a CL50 (concentração letal para 50% das larvas). Essa concentração foi calculada por meio de regressão linear do log-Probit, utilizando-se o programa de computador microprobit (FINNEY, 1971).

Os ensaios foram executados com vinte larvas, as quais foram colocadas em recipientes contendo 100mL de água destilada. Após aplicação do produto com as concentrações adequadas, as larvas foram mantidas a 25 °C (+/- 2 °C) por um período de 24 horas, quando então, procedeu-se a leitura do ensaio quanto à mortalidade das mesmas.

Todos os bioensaios foram feitos em triplicata.

4.9.2 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A quantificação das unidades formadoras de colônia foi feita diluindo-se 1mL da cultura em frascos contendo 9mL de solução salina estéril de cloreto de sódio (NaCl) a 0.85%. Após diluições em série em frascos contendo salina, 0,5mL das amostras diluídas foram inoculadas por espalhamento superficial em placas contendo Agar nutriente.

As placas foram mantidas a 30 °C por um período de 24 horas, quando então se fez a contagem das unidades formadoras de colônia. Foram desconsideradas as placas com mais de 300 UFC ou menos de 30 UFC. Considerando-se as diluições procedidas, fez-se o cálculo das unidades formadoras de colônia na cultura inicial. Essa análise foi feita em triplicata e expressa como logaritmo de UFC por mililitro de cultura.

4.9.3 Quantificação de Esporos

Para a quantificação de esporos, os frascos de salina com cultura diluída, após utilização na quantificação de UFC, foram mantidos a 80 °C por 20 minutos. Após esse

período, fez-se o espalhamento de 0,5mL da respectiva diluição, como descrito para a determinação de UFC. Essa análise foi feita em triplicata e expressa como porcentagem de esporulação, a qual foi calculada com base nos valores de UFC.

4.9.4 Biomassa Seca (Gravimetria)

Na etapa de estudo da cinética, a biomassa seca foi utilizada para verificar o crescimento do microrganismo. Para isso, 4mL da cultura foram centrifugados a $4500 \times g$, $5^{\circ}C$ por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 4mL de solução salina de cloreto de sódio (0,85%) e centrifugado novamente em iguais condições.

O sobrenadante da segunda centrifugação foi desprezado e o precipitado ressuspendido novamente em 4mL da solução salina. Alíquotas de 1mL foram transferidas para cadinhos previamente tarados, os quais foram submetidos a $105^{\circ}C$ até peso constante.

Essa análise foi feita em duplicata e expressa como miligramas de biomassa por mililitro da cultura. A fim de não se aferir como biomassa algum componente do meio de cultura, esse foi submetido a centrifugações, como descrito acima, e o valor de massa seca do meio de cultura foi descontado do valor da biomassa seca dos experimentos.

4.9.5 Turbidimetria

Na etapa do estudo da cinética, o crescimento do microrganismo foi verificado também por meio de teste de turbidimetria. Para isso, fez-se uma curva de calibração de uma cultura em meio Arcas adaptado relacionando absorvância a 540nm e biomassa seca (mg/mL).

O segundo precipitado do item 4.9.4, foi diluído em salina e sua absorvância lida em espectrofotômetro a 540nm. Por meio da curva de calibração, calculou-se, então, a concentração da biomassa da cultura, expressa como miligramas de biomassa por mililitros da cultura.

Essa análise foi feita em duplicata. Como o meio de cultura poderia conter alguns pigmentos que interferissem na análise da absorvância, foi feita uma leitura do

sobrenadante do meio de cultura (sem crescimento microbiano) centrifugado, e essa absorvância foi descontada do valor da absorvância dos experimentos.

4.9.6 Lâminas para Análise Microscópica

A fim de acompanhar a morfologia das células durante o estudo da cinética, bem como para averiguar se havia contaminação nos demais experimentos, foram feitas lâminas para análise em microscópio óptico.

Para confecção das lâminas, alíquotas das culturas foram retiradas com auxílio de uma alça de platina. Após esfregaço e fixação por calor, as lâminas foram coradas com solução de amido-black (por 70 segundos), lavadas e coradas com solução de fucsina (10 segundos). As composições e a forma de preparo das soluções utilizadas nessa análise encontram-se descritas no Anexo 2. Essa coloração evidencia os esporos e cristais de *B. thuringiensis*.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os planejamentos experimentais, montagem dos gráficos de superfície de resposta, bem como os testes de análise de variância (ANOVA) foram feitos utilizando-se o programa Statistic versão 6.0. Os demais gráficos foram feitos com auxílio do programa Excel (versão 2003). As comparações entre as CL50 foram feitas utilizando-se o teste de τ -Student.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DAS FONTES DE NUTRIENTES

Embora tenha sido estudado o crescimento e esporulação do microrganismo, a otimização desse estudo visou à produção de toxinas, ou seja a toxicidade da cultura, por isso, a mortalidade das larvas, avaliada por meio do bioensaio, foi a resposta utilizada na escolha das fontes e na etapa de otimização. A Tabela 5.1 apresenta os resultados reais da etapa de seleção de fontes para UFC/mL, porcentagem de esporulação e mortalidade das larvas a 10ppm (v/v). Esses resultados foram analisados no programa Statistic versão 6.0, onde foi possível calcular o efeito de cada fonte sobre o resultado, bem como a significância dos mesmos. Esses efeitos podem ser entendidos como a variação causada na resposta quando se percorre todos os níveis da variável (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Na prática, os efeitos são calculados como a diferença entre a média das respostas nos níveis das variáveis (BARROS NETO *et al.*, 1995). A Tabela 5.2 apresenta os efeitos das diferentes fontes de nutrientes testadas sobre a mortalidade das larvas a uma concentração de 10ppm (v/v).

Além dos efeitos, em um estudo de seleção e otimização é necessário considerar o coeficiente de determinação (R), o qual expressa a porcentagem de respostas explicadas pelos efeitos das variáveis. Ou seja, quanto maior o valor do coeficiente mais confiável é o estudo, pois a aleatoriedade influenciou pouco nas respostas. Para se entender como é feito o cálculo do coeficiente de determinação, é necessário conhecer o conceito de resíduo. Ao se realizar um experimento e plotar os resultados em um gráfico, vê-se que não há uma reta que passe por todos os resultados; por isso faz-se uma reta que passe pela maior quantidade possível de pontos. A diferença entre o valor real e o valor por onde passa a reta média é conhecido como resíduo, ou seja, é a diferença entre um valor real e a média prevista. O cálculo do coeficiente de determinação é feito com base na soma dos resíduos e nos efeitos das variáveis. Quanto maior o valor dos resíduos, menor o coeficiente de determinação, menos significativo o modelo, ou seja, a variação em torno da média é explicada pelos resíduos e não devido ao efeito das variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Nessa etapa do estudo, o coeficiente de determinação foi de 0,996; o que significa que 99,6% dos resultados são devido ao efeito das variáveis, sendo o estudo bastante significativo.

Tabela 5.1 – Resultados do bioensaio, UFC/mL e porcentagem de esporulação na etapa de seleção das fontes de nutrientes. Os números (+1) e (-1) indicam, respectivamente, os níveis máximos e mínimos de cada variável. Os valores entre parênteses correspondem aos valores reais das variáveis em g/L.

Ensaio	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Fécula de mandioca (g/L)	Farinha de soja (g/L)	Farinha de crisálida (g/L)	Peptona de carne (g/L)	Uréia (g/L)	Sulfato de amônia (g/L)	Bioensaio (10ppm)	UFC/ mL (log)	Esporulação (%)
1	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	-1 (0,2)	100,00%	12,090	77,87%
2	1 (10)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	1 (5,0)	1 (20)	1 (20)	100,00%	13,079	70,76%
3	-1 (1,0)	1 (10)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,5)	1 (20)	1 (20)	100,00%	12,740	74,81%
4	1 (10)	1 (10)	-1 (1,5)	-1 (5,0)	1 (20)	1 (5,0)	-1 (0,2)	-1 (0,2)	100,00%	12,676	86,18%
5	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1 (15)	-1 (5,0)	1 (20)	1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,2)	32,00%	12,130	74,54%
6	1 (10)	-1 (1,0)	1 (15)	-1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	1 (20)	96,00%	10,698	77,59%
7	-1 (1,0)	1 (10)	1 (15)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	1 (5,0)	-1 (0,2)	1 (20)	100,00%	12,505	73,81%
8	1 (10)	1 (10)	1 (15)	-1 (5,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	1 (20)	-1 (0,2)	0,00%	11,602	68,95%
9	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	1 (5,0)	1 (20)	1 (5,0)	-1 (0,2)	1 (20)	100,00%	13,245	71,44%
10	1 (10)	-1 (1,0)	-1 (1,5)	1 (50)	1 (20)	-1 (0,5)	1 (20)	-1 (0,2)	0,00%	11,778	73,86%
11	-1 (1,0)	1 (10)	-1 (1,5)	1 (50)	-1 (2,0)	1 (5,0)	1 (20)	-1 (0,2)	0,00%	12,544	75,55%
12	1 (10)	1 (10)	-1 (1,5)	1 (50)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	1 (20)	90,00%	12,389	71,86%
13	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1 (15)	1 (50)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	1 (20)	1 (20)	0,00%	12,255	71,91%
14	1 (10)	-1 (1,0)	1 (15)	1 (50)	-1 (2,0)	1 (5,0)	-1 (0,2)	-1 (0,2)	0,00%	11,653	74,09%
15	-1 (1,0)	1 (10)	1 (15)	1 (50)	1 (20)	-1 (0,5)	-1 (0,2)	-1 (0,2)	10,00%	11,000	75,43%
16	1 (10)	1 (10)	1 (15)	1 (50)	1 (20)	1 (5,0)	1 (20)	1 (20)	0,00%	11,845	72,62%

Tabela 5.2 – Efeito das fontes de nutrientes testadas sobre a mortalidade das larvas (bioensaio), crescimento microbiano (UFC/ml) e esporulação na etapa de seleção dos componentes do meio. Em vermelho, as variáveis com efeito significativo (ANOVA, $p < 0,05$).

	Efeito (bioensaio)	Efeito (crescimento microbiano)	Efeito esporulação
Variáveis/Interações	0,517500	12,13957	0,744544
(1) Sacarose	-0,070000	-0,34854	-0,024738
(2) Glicose	-0,035000	0,04654	-0,013088
(3) Fécula de mandioca	-0,440000	-0,85664	-0,014988
(4) Farinha de soja	-0,535000	-0,10149	0,008388
(5) Farinha de crisálida	0,060000	-0,25036	0,005138
(6) Peptona bacteriológica	0,045000	0,64061	-0,006062
(7) Uréia agroindustrial	-0,455000	0,21449	-0,034088
(8) Sulfato de amônia	0,430000	0,41049	0,019338

Com base nos resultados obtidos no planejamento experimental (Tabela 5.2) as fontes de carbono: sacarose, glicose e fécula de mandioca apresentaram um efeito negativo sobre a mortalidade das larvas. Embora, o efeito apresentado para a glicose não tenha sido positivo, seu resultado não foi significativo, então este componente foi escolhido como fonte de carbono para as etapas posteriores.

Diferente dos trabalhos de Içgen et al. (2002b) e Öskan et al. (2003), esses resultados não apontam a sacarose como uma boa fonte para produção de toxinas, tendo em vista seu efeito negativo avaliado no bioensaio. O que ressalta a importância de um estudo direcionado para cada linhagem específica, bem como para o resultado que se pretende otimizar.

Quanto ao crescimento microbiano, a análise das Unidades Formadoras de Colônia (log UFC/mL) demonstrou que a sacarose e a glicose não tiveram efeito significativo sobre o crescimento, já a fécula de mandioca apresentou um efeito negativo. Esses resultados podem ser observados na Tabela 5.2. Isso provavelmente ocorreu, devido à maior complexidade estrutural da fécula de mandioca frente às outras fontes, o que dificultou a utilização da mesma durante o crescimento microbiano. Embora *B. thuringiensis* sintetize enzimas amilolíticas, o amido parece não ser a fonte preferível de carbono (IÇGEN et al.; 2002b). No trabalho de Öskan et al. (2003), o amido, cuja estrutura é semelhante à fécula, também apresentou um efeito negativo sobre o crescimento de *B. thuringiensis israelensis*

HD500, os autores atribuem tal efeito à complexidade da estrutura química da molécula. Muitos meios que utilizam materiais complexos, como águas residuais do processamento de amido, fazem um pré-tratamento antes da utilização em meios de cultivo (YEZZA et al., 2006; CHANG et al., 2008).

Dentre as fontes de nitrogênio orgânico, uréia agroindustrial e farinha de soja apresentaram efeito significativo, porém negativo sobre a mortalidade das larvas. Já a farinha de crisálida e peptona bacteriológica não apresentaram efeito significativo sobre a morte das larvas, sendo necessário escolher entre essas duas fontes para as etapas de otimização. Com o intuito de aproveitar resíduos agroindustriais e abaixar o custo da produção, foi escolhida para os testes posteriores a farinha de crisálida.

O sulfato de amônia apresentou um efeito significativo e positivo sobre a toxicidade do meio, o que indica sua importância como fonte de nitrogênio na produção da toxina, resultado semelhante aos estudos de İçgen et al. (2002a).

Em relação à multiplicação do microrganismo, dentre as fontes de nitrogênio, apenas a peptona apresentou um efeito significativo e positivo (Tabela 5.2). Porém, como o objetivo principal era a otimização das toxinas, essa fonte não foi escolhida para as etapas posteriores.

Quanto à esporulação (Tabela 5.2), nenhuma das fontes de carbono ou nitrogênio apresentou efeito significativo sobre tal parâmetro. A taxa de esporulação foi alta em todos os experimentos dessa etapa, em média de 74,45% (Tabela 5.1).

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE NUTRIENTES SELECIONADAS

5.2.1 Planejamentos Fatoriais Incompletos

Após a seleção da glicose, farinha de crisálida e sulfato de amônio como fontes de nutrientes, a concentração dessas variáveis no meio de cultivo foi otimizada visando aumentar a toxicidade do meio contra larvas de *A. aegypti*.

Durante a otimização de um meio de cultivo, ou processo, tem-se por objetivo criar um modelo que explique matematicamente a maior parte dos resultados obtidos. Esses modelos são representados por equações matemáticas, que podem ser de primeiro ou

segundo grau. Por isso, nessa etapa são apresentados os coeficientes da equação matemática das diferentes variáveis, tanto para o termo linear (equação de primeiro grau), como para o termo quadrático (equação de segundo grau) (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Como a superfície de resposta visa mapear uma área de resultado ótimo, em geral, as variáveis estão na região de ótimo quando seu termo quadrático é significativo. Já o termo linear significativo indica que a otimização deve ainda continuar, ou no sentido de aumento das variáveis (quando o efeito do termo linear é positivo) ou na diminuição das variáveis (quando o efeito do termo linear é negativo).

Inicialmente foi feito um planejamento fatorial incompleto, cujos resultados reais e dos efeitos encontram-se nas Tabela 5.3 e 5.4 e nos Gráfico 5.1 a 5.3.

Tabela 5.3 – Resultados do bioensaio na primeira etapa de otimização. Os números (+1) e (-1) indicam, respectivamente, os níveis máximos e mínimos de cada variável. Os valores entre parênteses correspondem aos valores reais das variáveis em g/L.

Ensaio	Glicose	Sulfato de amônia	Farinha de crisálida	Bioensaio (% de morte em 1ppm)
1	-1 (2,0)	-1 (2,0)	-1 (10,0)	4
2	-1 (2,0)	0 (4,0)	1 (50,0)	22
3	-1 (2,0)	1 (6,0)	0 (30,0)	4
4	0 (6,0)	-1 (2,0)	1 (50,0)	14
5	0 (6,0)	0 (4,0)	0 (30,0)	8
6	0 (6,0)	1 (6,0)	-1 (10,0)	0
7	1 (10,0)	-1 (2,0)	0 (30,0)	8
8	1 (10,0)	0 (4,0)	-1 (10,0)	6
9	1 (10,0)	1 (6,0)	1 (50,0)	20

Os resultados desse primeiro planejamento fatorial apresentaram um coeficiente de determinação de 0,97; sendo satisfatório para estudos biológicos.

Tabela 5.4 – Efeito das fontes testadas sobre a toxicidade do meio avaliada por meio do bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto – otimização das fontes). Em vermelho, as variáveis com efeito significativo (ANOVA, $p < 0,05$). L representa o termo linear e Q o termo quadrático.

	Efeito	Probabilidade	Coefficiente da equação do modelo matemático
Variáveis.	9,55556	0,006958	9,55556
Glicose (L)	1,33333	0,566987	0,66667
Glicose (Q)	-3,33333	0,188893	-1,66667
(2) Sulfato de amônia(L)	-0,66667	0,766450	-0,33333
Sulfato de amônia(Q)	3,66667	0,163685	1,83333
(3) Farinha de crisálida(L)	15,33333	0,015991	7,66667
Farinha de crisálida(Q)	-4,33333	0,125525	-2,16667

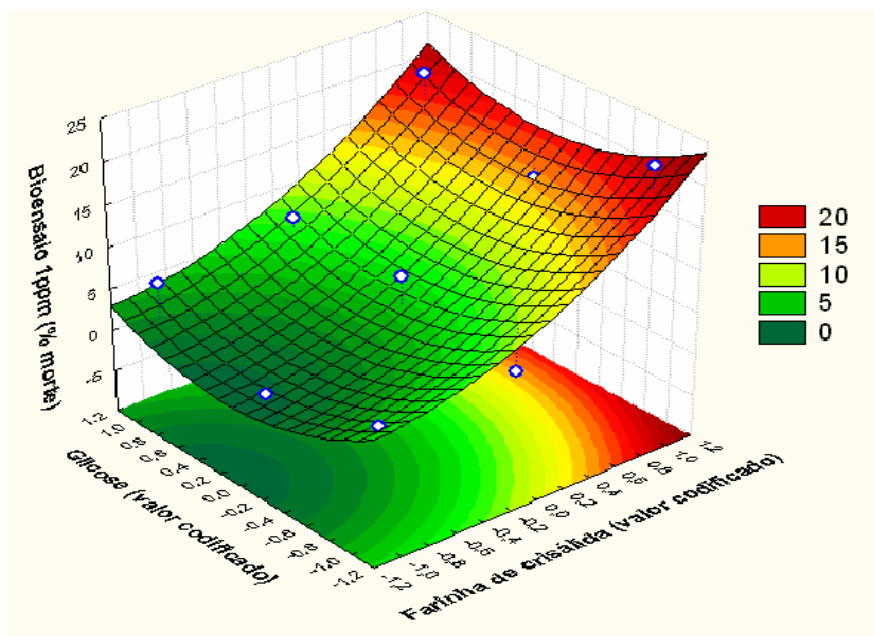


Gráfico 5.1 – Superfície de resposta para variáveis glicose e farinha de crisálida, tendo como resposta a toxicidade avaliada por bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto). O sulfato de amônio está fixado no valor codificado central.

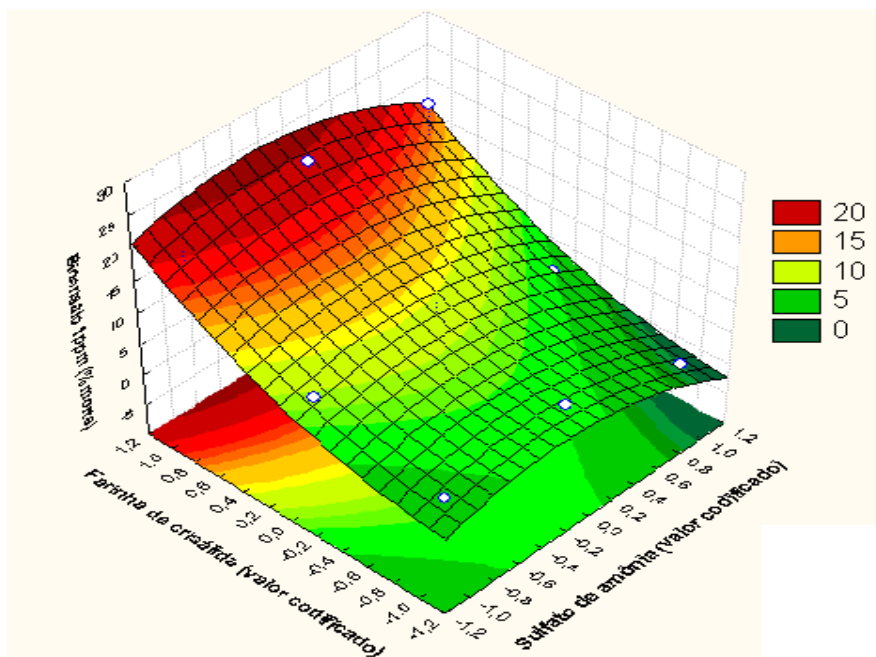


Gráfico 5.2 – Superfície de resposta para variáveis sulfato de amônia e farinha de crisálida, tendo como resposta a toxicidade avaliada por bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto). A glicose está fixado no valor codificado central.

Entre as variáveis testadas, a farinha de crisálida apresentou o termo linear altamente significativo e positivo; o que indica que esta fonte influenciou muito na toxicidade do meio, porém ainda não se encontra no seu ponto ótimo (termo quadrático não significativo). Observando os Gráficos 5.1 e 5.2, vê-se que a região de ótimo, representado em vermelho, está no sentido de aumento da concentração da farinha de crisálida. Por isso, para o segundo planejamento incompleto, os valores para a concentração de farinha de crisálida foram calculados a partir do ponto máximo (+1) do primeiro planejamento, ou seja, houve um aumento na concentração dessa fonte.

Em relação à glicose e ao sulfato de amônio, nenhum dos dois apresentou o termo quadrático ou linear significativo sobre a toxicidade avaliada por meio do bioensaio. No entanto, os valores dessas variáveis não foram fixados por esse experimento, por ele ser um fatorial incompleto, ou seja, poderia haver interações e efeitos significativos futuros.

Observando-se os gráfico 5.3 e 5.4, vê-se que há dois pontos em direção ao ótimo para a glicose, resultando em um gráfico com formato de “cela”. Como a produção visa à melhora da toxicidade do meio, conjuntamente com a diminuição dos custos, a otimização dessas duas variáveis prosseguiu no sentido de menor valor, ou seja, a glicose em torno dos

valor codificados -1,37 a -1,0; já o sulfato de amônia em torno dos valores codificados -1,5 e a 0,5.

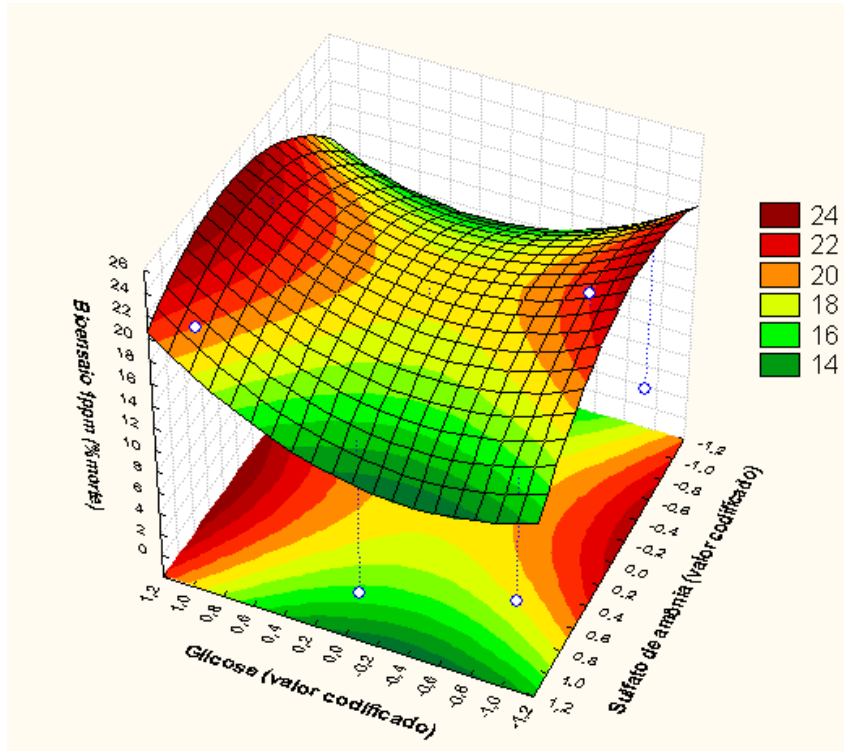


Gráfico 5.3 – Superfície de resposta (3 dimensões) para variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta a toxicidade avaliada por bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto). A farinha de crisálida está fixada no valor codificado +1.

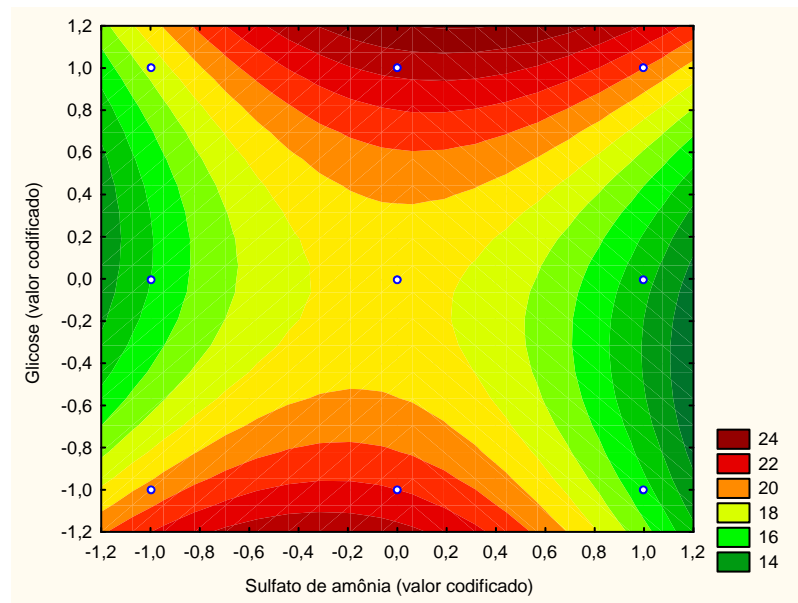


Gráfico 5.4 – Superfície de resposta (plana) para variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta a toxicidade avaliada por meio do bioensaio (primeiro planejamento fatorial incompleto). A farinha de crisálida está fixada no valor codificado +1.

Portanto, para o segundo experimento os valores da concentração da farinha de crisálida foram aumentados, já as concentrações de glicose e sulfato de amônia diminuíram, de acordo com a Tabela 4.5.

Os resultados do bioensaio bem como os efeitos das variáveis no segundo planejamento fatorial incompleto encontram-se nas Tabela 5.5 e 5.6, respectivamente.

Os resultados desse segundo planejamento fatorial apresentaram um coeficiente de determinação de 0,81, sendo satisfatório para estudos biológicos.

Tabela 5.5 – Resultados do bioensaio na segunda etapa de otimização (segundo planejamento fatorial incompleto). Os números (+1) e (-1) indicam, respectivamente, os níveis máximos e mínimos de cada variável. Os valores entre parênteses correspondem aos valores reais das variáveis em g/L.

Ensaio	Glicose	Sulfato de amônia	Farinha de crisálida	Bioensaio (% morte em 1ppm)
1	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (50,0)	68
2	-1 (0,5)	0 (3,0)	1 (130,0)	2
3	-1 (0,5)	1 (5,0)	0 (90,0)	32
4	0 (1,25)	-1 (1,0)	1 (130,0)	4
5	0 (1,25)	0 (3,0)	0 (90,0)	18
6	0 (1,25)	1 (5,0)	-1 (50,0)	10
7	1 (2,0)	-1 (1,0)	0 (90,0)	14
8	1 (2,0)	0 (3,0)	-1 (50,0)	22
9	1 (2,0)	1 (5,0)	1 (130,0)	2

Observando-se os efeitos das variáveis (Tabela 5.6) percebe-se que o sulfato de amônia e a farinha de crisálida apresentaram efeito quadrático não significativo, o que indica que essas fontes ainda não se encontram em seu ponto ótimo. Essas variáveis apresentaram o termo linear significativo e negativo, o que indica que para alcançar seu nível ótimo, a concentração dessas variáveis deve diminuir.

Em relação à glicose, tanto o termo linear como o quadrático foram significativos, o que pode indicar uma interação com outra variável ou dois destinos de otimização, o aumento ou diminuição de sua concentração, o que levaria a formação do chamado “ponto de cela”.

Tabela 5.6 – Efeito das fontes testadas sobre a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto – otimização das fontes). Em vermelho, as variáveis com efeito significativo (ANOVA, $p < 0,05$). L representa o termo linear e Q o termo quadrático.

	Efeitos	Probabilidade	Coefficiente do modelo matemático.
Variáveis.	19,7778	0,000012	19,7778
Glicose (L)	-19,3333	0,012189	-9,6667
Glicose (Q)	-13,6667	0,032552	-6,8333
Sulfato de amônia(L)	-14,6667	0,044148	-7,3333
Sulfato de amônia(Q)	-6,6667	0,258147	-3,3333
Farinha de crisálida(L)	-32,0000	0,000431	-16,0000
Farinha de crisálida(Q)	3,3333	0,563070	1,6667

Os Gráficos 5.5 a 5.7 ilustram o efeito das variáveis sobre a toxicidade do meio avaliada por meio de bioensaio, no segundo planejamento fatorial incompleto.

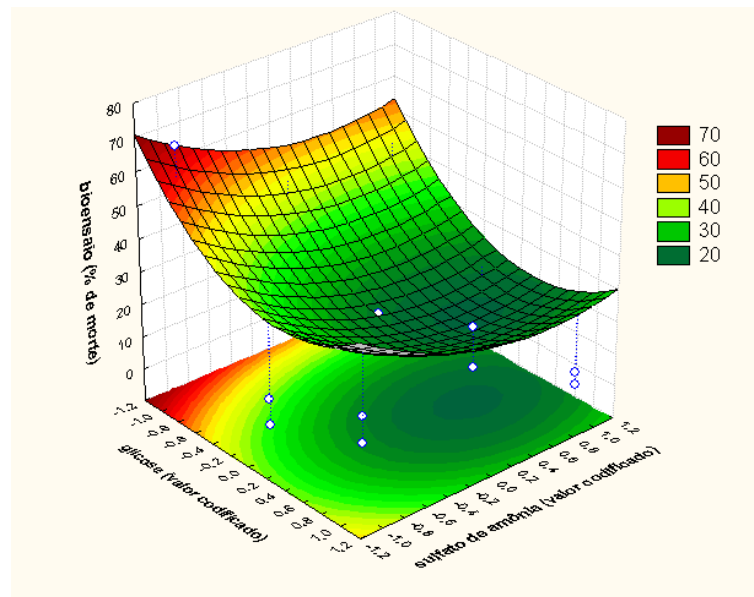


Gráfico 5.5 – Superfície de resposta para variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto). A farinha de crisálida está fixada no valor codificado -1.

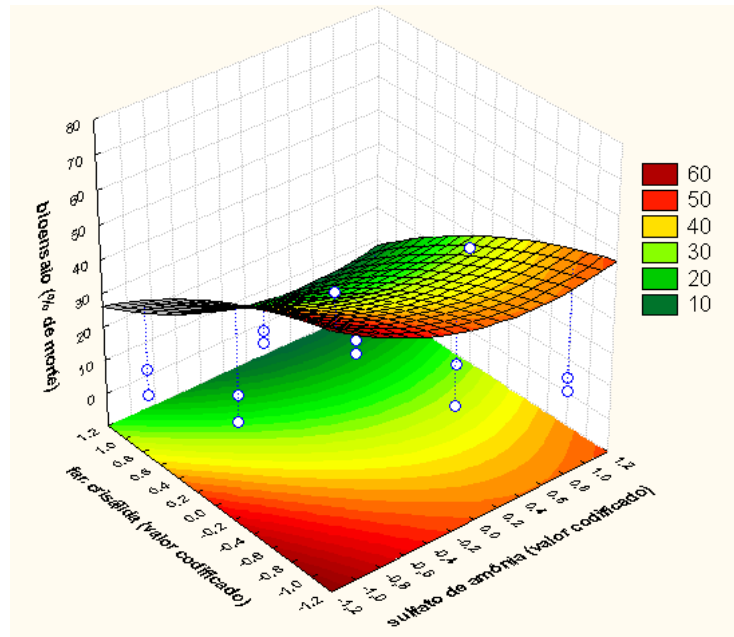


Gráfico 5.6 – Superfície de resposta para variáveis sulfato de amônia e farinha de crisálida, tendo como resposta a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto). A glicose está fixada no valor codificado -1.

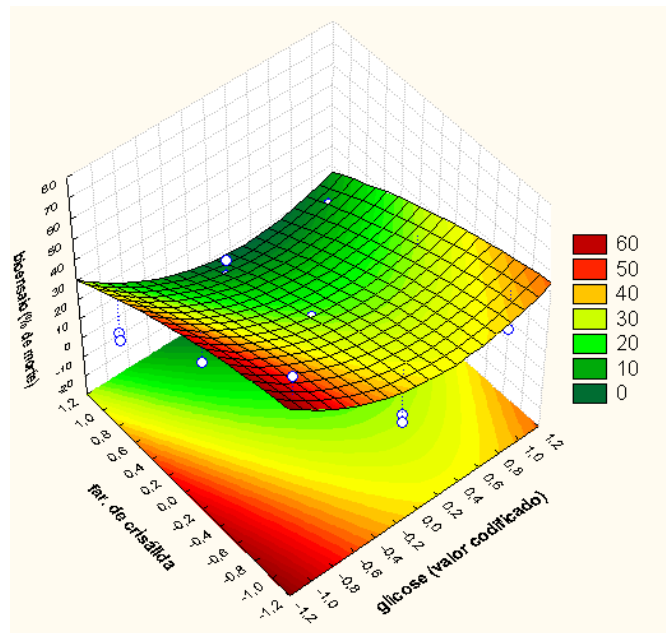


Gráfico 5.7 – Superfície de resposta para variáveis farinha de crisálida e glicose, tendo como resposta a toxicidade do meio (bioensaio) (segundo planejamento fatorial incompleto). O sulfato de amônia está fixado no valor codificado -1.

Embora nessa etapa as variáveis ainda não se encontrem no seu nível ótimo, já houve uma melhora na resposta; nota-se um aumento de 24 para 70% na taxa de morte das larvas do primeiro para o segundo planejamento fatorial incompleto (Gráficos 5.3 e 5.5, respectivamente). Esses valores referem-se à previsão da resposta segundo o modelo, os valores reais para tal resposta foram de 22 e 68% de mortes no primeiro e segundo planejamento, respectivamente (Tabelas 5.3 e .5).

Tendo em vista os efeitos das variáveis sobre a toxicidade do meio, a otimização prosseguiu mapeando a região próxima ao ponto mínimo (-1) do segundo planejamento fatorial incompleto. Nesse ponto, as variáveis apresentavam os seguintes valores (g/L): 0,5 de glicose, 1,0 de sulfato de amônia e 50 de farinha de crisálida.

Com o objetivo de verificar se o ponto mínimo (-1) do segundo experimento deveria ser mesmo o ponto central em um planejamento fatorial completo, foram feitos três ensaios (A, B e C) com valores próximos a esse ponto mínimo. Os valores das variáveis nesses três ensaios bem como o resultado do bioensaio encontram-se na Tabela 5.4.

Tabela 5.7 – Ensaios para confirmação do ponto central (g/L): 0,5 de glicose, 1,0 de sulfato de amônia e 50 de farinha de crisálida. Valor das variáveis e resultado do bioensaio.

Ensaios	Glicose (g/L)	Sulfato de amônia (g/L)	Farinha de crisálida (g/L)	Bioensaio (% de morte das larvas em 1ppm)
A	0,9	1,8	66	50
B	0,7	1,4	58	46
C	0,3	0,6	42	38

Os resultados apresentados 50, 46 e 38 % de morte de larvas para os ensaios A, B e C respectivamente evidenciam que nenhum dos três ensaios resultou em uma melhor resposta do que a anteriormente obtida no ponto mínimo (-1) do segundo planejamento fatorial incompleto (60%), portanto, esse ponto foi utilizado como central no planejamento completo.

5.2.2 Planejamento Fatorial Completo

O planejamento fatorial completo apresenta melhor resolução, permitindo o estudo das interações entre as variáveis, já que todos os experimentos possíveis são realizados. Nessa etapa, esse planejamento “mapeou” a região próxima ao ponto central (g/L): 0,5 de glicose, 1,0 de sulfato de amônia e 50 de farinha de crisálida. Os níveis das variáveis no planejamento fatorial completo encontram-se na Tabela 4.7.

Inicialmente foram feitos os experimentos do bloco 1 (Tabela 5.8), porém analisando-se os resultados verificou-se que o modelo linear não explica adequadamente essa fermentação, por isso, fez-se um segundo bloco incluindo os pontos estrelas. Esses pontos correspondem ao planejamento inicial, porém com uma rotação de 45 ° em relação ao ponto de partida. Dessa maneira, é possível estabelecer um modelo quadrático (equação de segundo grau) para o processo em estudo.

Além dos pontos estrelas, o planejamento fatorial completo apresentou uma repetição no ponto central, que permite a estimativa do erro puro, ou seja, o que é inerente ao processo. Esse planejamento é também conhecido como Delineamento Composto Central Rotacional (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Os resultados (bioensaio, UFC e porcentagem de esporulação) desse planejamento fatorial completo, incluindo os pontos estrelas, encontram-se na Tabela 5.8. Os resultados da análise de variância para o bioensaio e dos efeitos para as respostas analisadas encontram-se nas Tabelas 5.9 e 5.10, respectivamente.

O erro puro não foi significativo, bem como a variação referente aos blocos (Tabela 5.9). O erro puro refere-se à variação da resposta inerente ao processo, como este não foi significativo, o estudo apresentou-se robusto, ou seja, os resultados do bioensaio explicam-se pelo variação das fontes e não pelo acaso. O fato de os blocos não terem sido significativos indica que a opção por fazer o experimento em duas etapas não prejudicou os resultados. Portanto, os fatores que mais influenciaram a resposta foram a concentração das fontes de nutrientes. Nessa etapa, todas as fontes apresentaram apenas o termo quadrático significativo, o que indica que as mesmas já alcançaram seu ótimo de concentração para a toxicidade do meio.

Tabela 5.8 – Respostas do Delineamento Composto Central Rotacional (planejamento fatorial completo, com repetição no ponto central e pontos estrelas).

Ensaio	Bloco	Glicose	Sulfato de Amônia	Farinha de. crisálida	Bioensaio (% morte)	log UFC	% esporulação
1	1	-1,00000	-1,00000	-1,00000	33,33	12,602	92,39
2	1	-1,00000	-1,00000	1,00000	53,33	13,978	93,65
3	1	-1,00000	1,00000	-1,00000	6,67	14,544	78,12
4	1	-1,00000	1,00000	1,00000	20,00	14,431	81,95
5	1	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,00	16,17	80,52
6	1	1,00000	-1,00000	1,00000	53,33	16,057	69,08
7	1	1,00000	1,00000	-1,00000	26,67	17,732	67,19
8	1	1,00000	1,00000	1,00000	33,33	15,903	74,78
9 (C)	1	0,00000	0,00000	0,00000	66,67	15,819	79,98
10 (C)	1	0,00000	0,00000	0,00000	60,00	15,924	83,33
11	2	-1,78885	0,00000	0,00000	22,50	14,851	84,2
12	2	1,78885	0,00000	0,00000	5,00	14,505	85,35
13	2	0,00000	-1,78885	0,00000	12,50	14,851	86,18
14	2	0,00000	1,78885	0,00000	10,00	16,158	81,34
15	2	0,00000	0,00000	-1,78885	7,50	15,556	83,504
16	2	0,00000	0,00000	1,78885	10,00	15,982	79,34

Tabela 5.9 – Análise de variância ($p < 0,05$) para a resposta bioensaio do delineamento composto central rotacional. Em vermelho, as variáveis com efeito significativo (ANOVA, $p < 0,05$). L representa o termo linear e Q o termo quadrático.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	Probabilidade
Blocos	699,213	1	699,213	4,058296	0,100067
Glicose (L)	68,056	1	68,056	0,395000	0,557271
Glicose (Q)	1161,907	1	1161,907	6,743809	0,048432
Sulfato de amônia(L)	231,940	1	231,940	1,346198	0,298329
Sulfato de amônia(Q)	1334,659	1	1334,659	7,746478	0,038753
Farinha de crisálida(L)	664,118	1	664,118	3,854601	0,106834
Farinha de crisálida(Q)	1519,379	1	1519,379	8,818610	0,031171
Interação glicose X sulfato (L)	555,444	1	555,444	3,223849	0,132522
Interação glicose X far. De crisálida (L)	88,844	1	88,844	0,515661	0,504843
Interação sulfato X farinha de crisálida (L)	355,644	1	355,644	2,064192	0,210292
Erro puro	861,462	5	172,292		
Total	7540,666	15			

Tabela 5.10 – Efeito das fontes de nutrientes sobre o bioensaio, crescimento e esporulação (delineamento composto central rotacional). Em vermelho, as variáveis com efeito significativo (ANOVA, $p < 0,05$). L representa o termo linear e Q o termo quadrático.

	Efeito (bioensaio)	Probabilidade (bioensaio)	Coefficiente matemático (bioensaio)	Efeito (log UFC/mL)	Esporulação (%)
Principal/interações	55,9605	0,002818	55,9605	15,96467	83,52433
Blocos	-14,7490	0,100067	-7,3745	0,18633	3,73867
Glicose (L)	-4,3479	0,557271	-2,1740	1,34556	-7,28928
Glicose (Q)	-21,7725	0,048432	-10,8863	-0,86240	-0,38667
Sulfato de amônia(L)	-8,0267	0,298329	-4,0133	0,85292	-5,86917
Sulfato de amônia(Q)	-23,3350	0,038753	-11,6675	-0,34583	-1,02104
Farinha de crisálida(L)	13,5822	0,106834	6,7911	0,01153	-0,86233
Farinha de crisálida(Q)	-24,8975	0,031171	-12,4488	-0,18052	-2,48229
Interação glicose e sulf. de amônia (L)	16,6650	0,132522	8,3325	-0,24675	4,58500
Interação glicose e far. de crisálida (L)L	6,6650	0,504843	3,3325	-0,80125	-2,23500
Interação sulf. de amônia e far. de crisálida (L)	-13,3350	0,210292	-6,6675	-0,80125	5,40000

Em relação ao crescimento e esporulação, as concentrações testadas não apresentaram efeitos significativos para tais parâmetros (Tabela 5.10). No entanto, na região de ótimo para bioensaio o log médio de UFC foi de 15,87; já a esporulação média foi de 81,65%, o que indica um bom crescimento e esporulação (Tabela 5.8).

Os Gráficos 5.8 a 5.10 representam a superfície de resposta para o delineamento composto central rotacional.

Observa-se que a zona em vermelho escura nos gráficos, que corresponde à maior taxa de morte no bioensaio, encontra-se no centro do gráfico. Isso significa que para alcançar os melhores resultados de bioensaio pode-se trabalhar em intervalos de concentração das fontes que correspondem a tal área e, não necessariamente com um único valor fixo de concentração; o que facilita a produção. Para o sulfato de amônia, a faixa de variação da região de ótimo está entre (g/L) 0,6 a 1,1; já para a glicose é de 0,3 a 0,55g/L, enquanto que para a farinha de crisálida tal faixa encontra-se entre 55 a 58g/L.

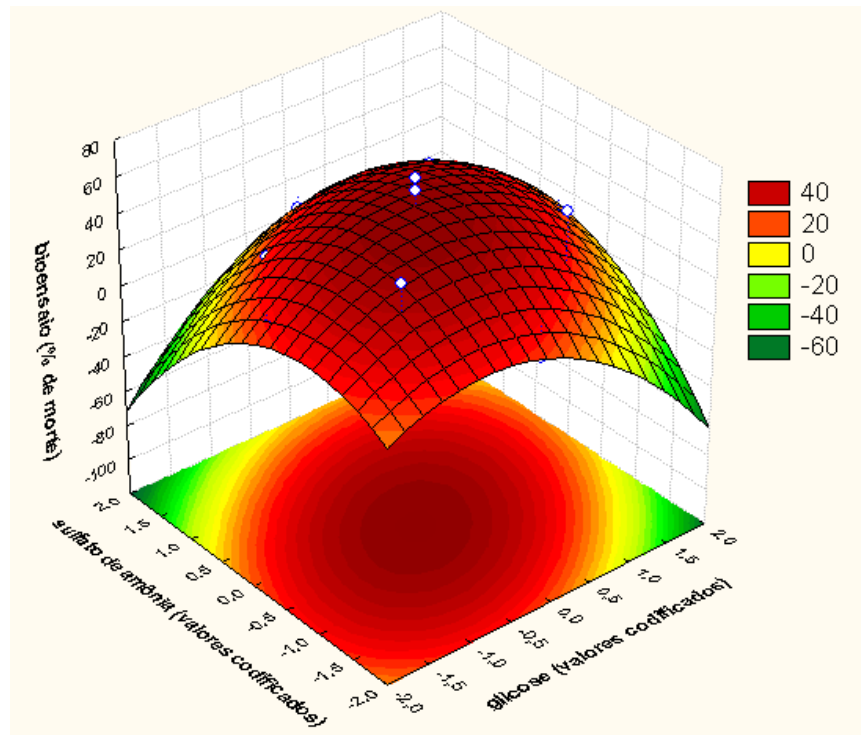


Gráfico 5.8 – Superfície de resposta para as variáveis sulfato de amônia e glicose, tendo como resposta o bioensaio (delineamento composto central rotacional). A farinha de crisálida está fixada no valor do ponto central.

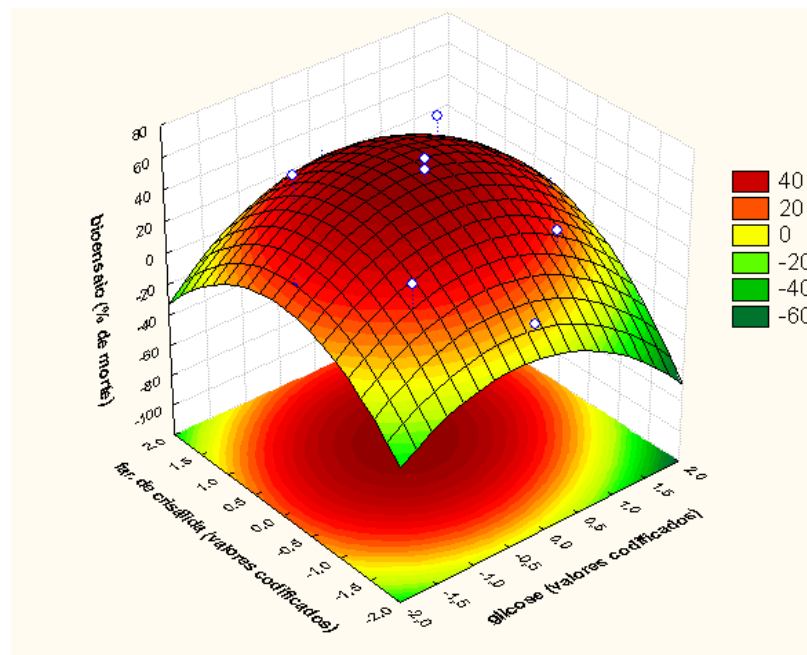


Gráfico 5.9 – Superfície de resposta para as variáveis farinha de crisálida e glicose, tendo como resposta o bioensaio (delineamento composto central rotacional). O sulfato de amônia encontra-se fixado no valor do ponto central.

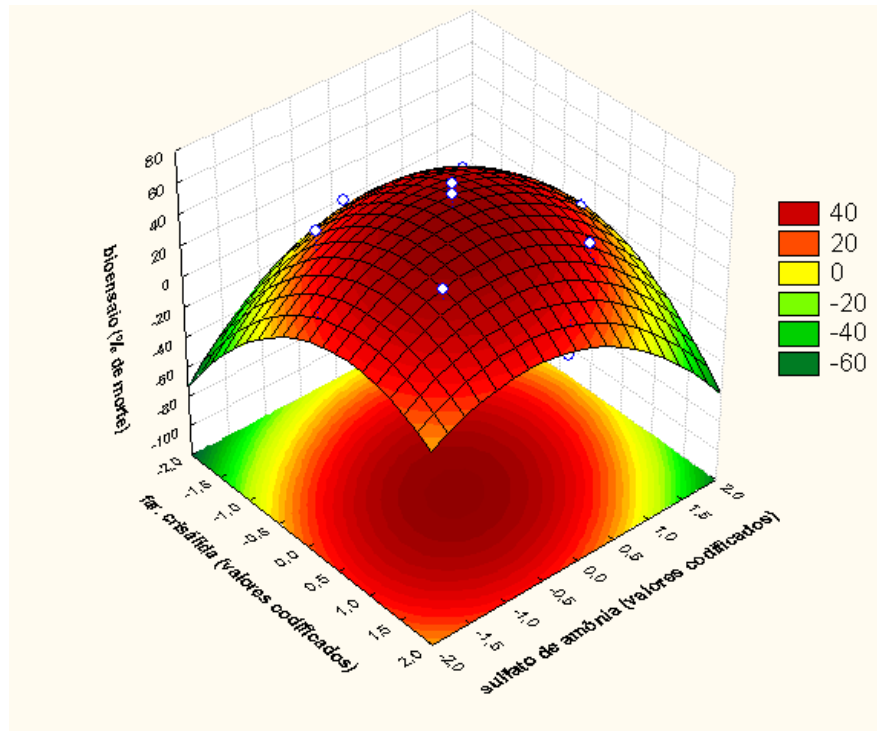


Gráfico 5.10 – Superfície de resposta para as variáveis farinha de crisálida e sulfato de amônia, tendo como resposta o bioensaio (delineamento composto central rotacional). A glicose encontra-se fixada no valor do ponto central.

A Tabela 5.10 apresenta o efeito das fontes de nutrientes sobre o bioensaio. Considerando-se apenas os efeitos significativos e o coeficiente, pode-se construir a equação quadrática, que explica matematicamente o efeito das fontes sobre o bioensaio:

$$Y = 55,96 - 10,89 A^2 - 11,67 B^2 - 12,45 C^2$$

Onde:

Y= valor do bioensaio em porcentagem de morte

A= concentração da glicose (valor codificado)

B= concentração do sulfato de amônia (valor codificado)

C= concentração da farinha de crisálida (valor codificado)

Com base na equação que representa o processo, foi possível prever os valores de bioensaio para diferentes valores das fontes de nutrientes.

O Gráfico 5.11 relaciona os valores previstos com os valores observados nos bioensaios; observa-se que houve uma correlação considerável entre esses valores. O coeficiente de determinação desse delineamento (R) foi de 0,88; o que indica que 88% da variação é explicada pelo modelo.

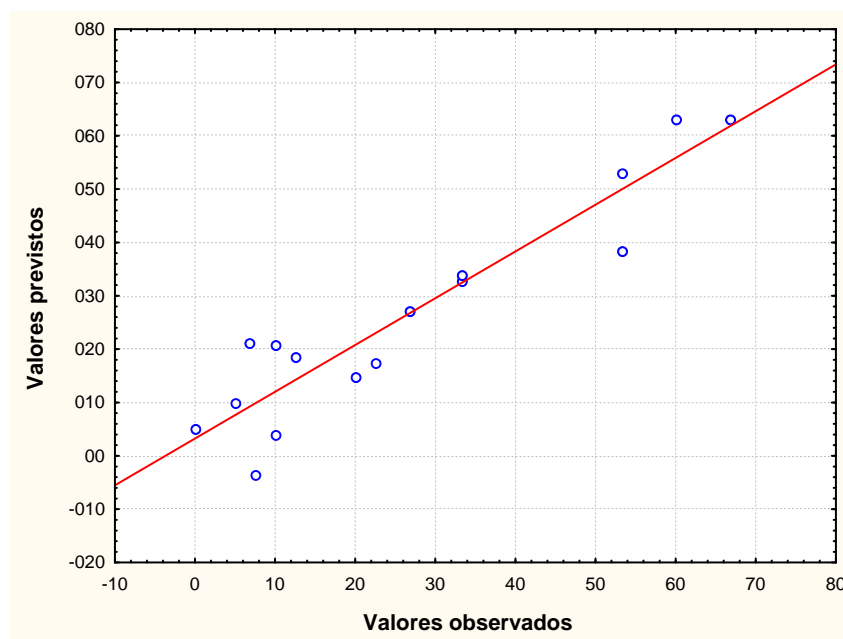


Gráfico 5.11 – Valores observados e previstos para o bioensaio (% de morte). Correlação de 88%.

A Tabela 5.11 apresenta algumas combinações de valores das variáveis bem como o bioensaio previsto. Observa-se que há uma ampla faixa onde a variação do bioensaio é mínima. O valor máximo previsto pelo modelo foi de 56,82%, no entanto, o valor máximo de morte das larvas observado nos ensaios desta etapa foi de 66,67% (Tabela 5.8), ou seja, a taxa de morte obtida experimentalmente é até mesmo superior àquela apontada pelo modelo.

Tabela 5.11 – Valores previstos para o bioensaio em diferentes concentrações das fontes de nutrientes.

Previsão (bioensaio)	Glicose (codificado)	Glicose (real)	Sulfato (codificado)	Sulfato (real)	Farinha (codificado)	Farinha (real)
55,9605	0	0,5 g/L	0	1 g/L	0	50 g/L
55,08828	-0,4	0,4	0	1 g/L	0	50 g/L
56,2965	0	0,5 g/L	-0,2	0,9	0	50 g/L
54,16821	0	0,5 g/L	-0,6	0,7	0	50 g/L
56,8208	0	0,5 g/L	0	1 g/L	0,2	52
56,6851	0	0,5 g/L	0	1 g/L	0,4	54
55,55362	0	0,5 g/L	0	1 g/L	0,6	56

Mesmo nos gráficos que representam a superfície de resposta, a zona de maior morte no bioensaio corresponde a cerca de 40% (Gráficos 5.8 a 5.10). Essas diferenças entre os valores máximos previstos e obtidos justificam-se pelo ajuste que o modelo matemático deve apresentar para que a maior parte dos dados seja explicada por ele.

Muitos autores relatam o efeito repressor da glicose sobre a produção de toxinas por *B. thuringiensis*; porém, esse fato não se observou nessa etapa final da otimização, provavelmente porque as concentrações de glicose na região ótima foram baixas (entre 0,3 e 0,5g/L), quando comparada aos valores de outros estudos (em média 1,0g/L) (ÖSKAN *et al.*; 2003). Nas etapas iniciais da otimização, quando a concentração de glicose variou entre 1,25 a 10g/L, os resultados do bioensaio foram bem baixos, em torno de 12% de morte das larvas. Possivelmente, nessa etapa a glicose estaria reprimindo a produção de toxina.

Assim como nos trabalhos de İçgen *et al.* (2002b), o sulfato de amônia mostrou-se uma boa fonte de nitrogênio orgânico para a produção de toxinas por *B. thuringiensis*. A concentração ótima dessa fonte (1,0g/L) foi metade do que geralmente se costuma utilizar na indústria, o que leva a uma redução dos custos de produção (COUCH, 2000).

Logo no início da descoberta de *B. thuringiensis*, em 1902, ele foi isolado a partir de larvas infectadas de *Bombix mori*. Desde então, já é conhecida a capacidade de desenvolvimento desta bactéria em meios de cultivo à base de fontes animais de nutrientes (BRAR *et al.*, 2006; CAPALBO *et al.*, 2004; VIDAURRE, 1996). Os bons resultados obtidos no meio à base de farinha de crisálida confirmam esse fato. Além disso, o fato desse meio ter alcançado resultados promissores reforça que o hábitat de *B. thuringiensis* é o próprio inseto, onde ocorrem suas interações genéticas e seu metabolismo estaria mais adaptado (RAYMOND *et al.*, 2008; VILAS-BÔAS *et al.*, 2000).

A farinha de crisálida apresenta uma composição bastante rica, destacando principalmente como fonte de proteínas e aminoácidos, portanto de nitrogênio orgânico. O Anexo 3 apresenta uma tabela com a constituição dessa farinha, essas análises foram feitas pelo laboratório Labtec (Campinas) e, gentilmente, cedida pelo professor Amarildo Passini (Departamento de Agronomia, UEL). Embora apresente os minerais potássio, magnésio, zinco, ferro e cobalto; a concentração desses é baixa, por isso foi utilizada a mistura de sais minerais no meio de cultivo. Alves *et al.* (1997) estudou vários ingredientes alternativos para o crescimento de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, a farinha de crisálida foi o mais promissor. Nesse estudo, a concentração utilizada foi de 10 g/L dessa farinha além de suplementação com sais e fonte de carbono.

A CL_{50} média do meio otimizado nesse estudo foi de 0,703ppm (v/v). Esse resultado foi comparado com o bioensaio de cultura feita em meio Arcas adaptado (ANDRADE, 2005); cuja CL_{50} média foi de 3,01ppm (v/v). Esses valores de CL_{50} (0,703 e 3,01ppm) diferiram estatisticamente, sendo que o meio à base de crisálida apresenta uma toxicidade cerca de 4,3 vezes maior do que o meio Arcas adaptado.

A Tabela 5.9 apresenta os custos referentes à matéria-prima para produção de 1L de meio a base de farinha de crisálida otimizado e do meio Arcas adaptado.

Tabela 5.12 – Custos em Reais dos meios de cultivo: Arcas adaptado e Farinha de crisálida otimizado.

Custos/Meios	Meio Arcas adaptado	Meio farinha de crisálida otimizado
Mistura de sais R\$	0,117 ^a	0,117 ^a
Extrato de levedura R\$	4,122 ^a	-
Glicose R\$	0,088 ^a	0,010 ^a
Farinha de crisálida R\$	-	0,182 ^b
Sulfato de amônia R\$	0,012 ^a	0,012 ^a
Custo total (1L) R\$	4,339	0,321

Fonte: ^(a) Induslab (S.D Teixeira Produtos Laboratoriais), ^(b) Bratac. Cotação feita em 13 de janeiro de 2008.

Além do meio otimizado apresentar um menor custo, sua toxicidade é maior, o que permite que ele seja diluído cerca de 4 vezes mais do que o meio Arcas adaptado. Dessa maneira, com 1L do meio crisálida otimizado é possível obter cerca de 4L de meio com igual toxicidade do meio Arcas adaptado. Portanto, o meio crisálida apresentou um custo 54,07 vezes menor do que o meio de cultivo Arcas adaptado.

Embora em um estudo de superfície de resposta o ótimo encontre-se em uma faixa e não em um valor fixo das variáveis, para os experimentos seguintes (cinética e armazenamento) foi adotado o valor das variáveis no ponto máximo previsto de toxicidade avaliada por meio de bioensaio. Esse ponto corresponde aos seguintes valores das variáveis (g/L): 0,5 de glicose; 1,0 de sulfato de amônia e 52,0 de farinha de crisálida. Além das fontes de carbono e de nitrogênio orgânico e inorgânico, o meio de cultura otimizado continha a mistura de sais, citadas no item 4.5, a qual não foi objeto de estudo.

5.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO ASSOCIADA À PRODUÇÃO DE TOXINAS

O estudo da cinética de crescimento de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* foi feito com o objetivo de verificar em qual etapa da fermentação a toxicidade da cultura é máxima e, com isso determinar o tempo de cultivo mais adequado, Segundo Couch (2000), as fermentações industriais de bactérias entomopatogênicas duram de 62 a 92 horas. Nesse estudo, a cultura foi monitorada por um período de 96 horas

O crescimento microbiano foi mensurado por meio de gravimetria e turbidimetria. Esses dois métodos apresentaram uma correlação de 0,93; como apresentado no Gráfico 5.12. No entanto, a metodologia de gravimetria apresentou um desvio padrão menor (2,04) em relação à turbidimetria (6,5) e, por isso, foi utilizada no estudo da cinética.

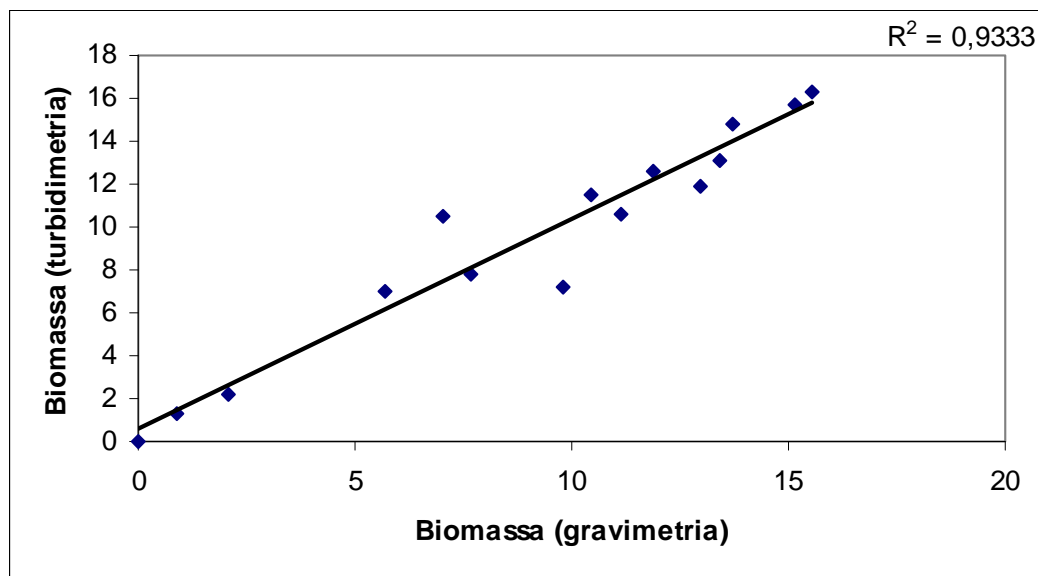


Gráfico 5.12 – Correlação entre a biomassa (mg/mL) mensuradas pelas metodologias de gravimetria e turbidimetria.

O Gráfico 5.13 apresenta o crescimento microbiano mensurado por meio de bioensaio, durante as 96 horas de cultivo.

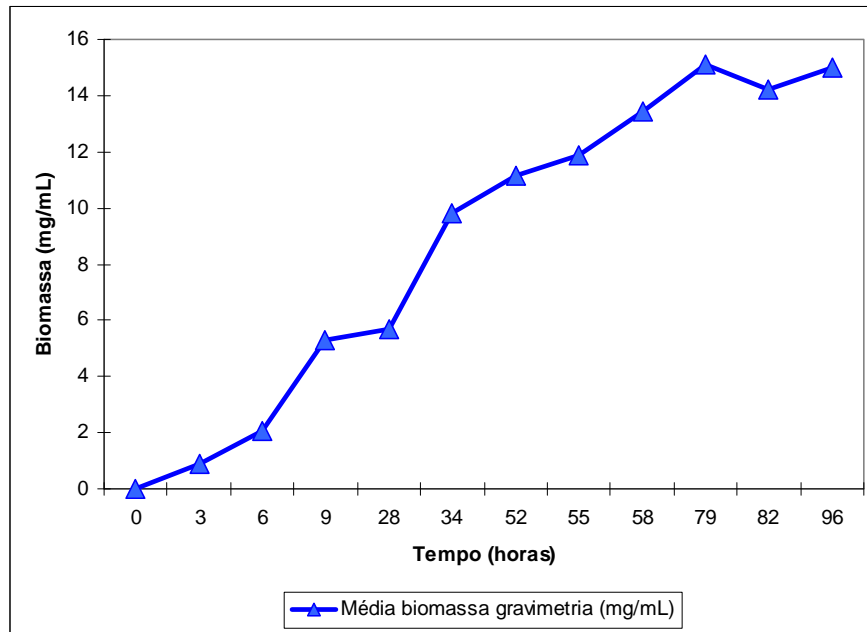


Gráfico 5.13 – Crescimento microbiano (biomassa) ao longo do cultivo (96 horas).

A fase de adaptação às condições de cultivo (lag) durou cerca de 9 horas; ou seja, apenas 9,37% do tempo de cultivo. A fase de crescimento exponencial ou logarítmica, a qual apresenta a maior taxa de aumento na quantidade total de células, correspondeu a cerca de 70% do tempo de cultivo; ao final da qual a biomassa correspondia a 15,13mg/mL. Para determinação dessa fase, foram feitos derivações e cálculos gráficos que evidenciaram o momento do cultivo em que a produção da biomassa passou a ser uma função matemática exponencial. O coeficiente de correlação da fase exponencial foi de 0,925, o que significa que cerca de 92% dos resultados dessa fase são explicados por uma equação logarítmica.

Por ser uma bactéria esporulante, *B. thuringiensis* apresenta uma fase estacionária, seguida pela esporulação com a formação de esporos elipsoidais, não apresentando uma fase de declínio. Nas fases estacionária e de esporulação, a quantidade total de células permanece praticamente constante. Nesse estudo, essas fases corresponderam a cerca de 20,55% do tempo de total de cultivo, quando a biomassa variou pouco e deixou de ser uma função exponencial em relação ao tempo.

A esporulação é uma forma de a bactéria sobreviver a situações adversas, visto que os esporos são estruturas mais resistentes. Em geral, a esporulação inicia na fase estacionária, quando a bactéria já consumiu grande parte das fontes de nutrientes e esse fator passa a ser uma limitante para o seu crescimento. Além disso, durante a fermentação, o

microrganismo pode produzir metabólitos que, com o acúmulo, acaba por inibir seu próprio crescimento (ALTERTHUM; CARVALHAL, 1999).

A maior parte das toxinas de *B. thuringiensis* é sintetizada durante a esporulação, portanto, diferente de muitos cultivos, a fase estacionária é bastante importante no cultivo dessa bactéria (LERECLUS *et al.*, 1993; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). A toxicidade da cultura alcançou seu melhor resultado por volta de 96 horas de cultivo, ou seja, já no período estacionário.

A fim de se verificar com maior precisão qual o momento de maior toxicidade, foram feitos bioensaios com cálculo de CL_{50} para a cultura com 72 horas e com 96 horas. O tempo de 72 horas foi escolhido por ter sido o adotado nas etapas anteriores. A cultura com 96 horas de cultivo apresentou uma CL_{50} média de 0,50ppm (v/v); que foi significativamente menor do que a cultura com 72 horas, a qual apresentou CL_{50} média de 0,70.

A Figura 5.1 apresenta fotomicroscopias da cultura de *B. thuringiensis israelensis* em diferentes momentos de cultivo.

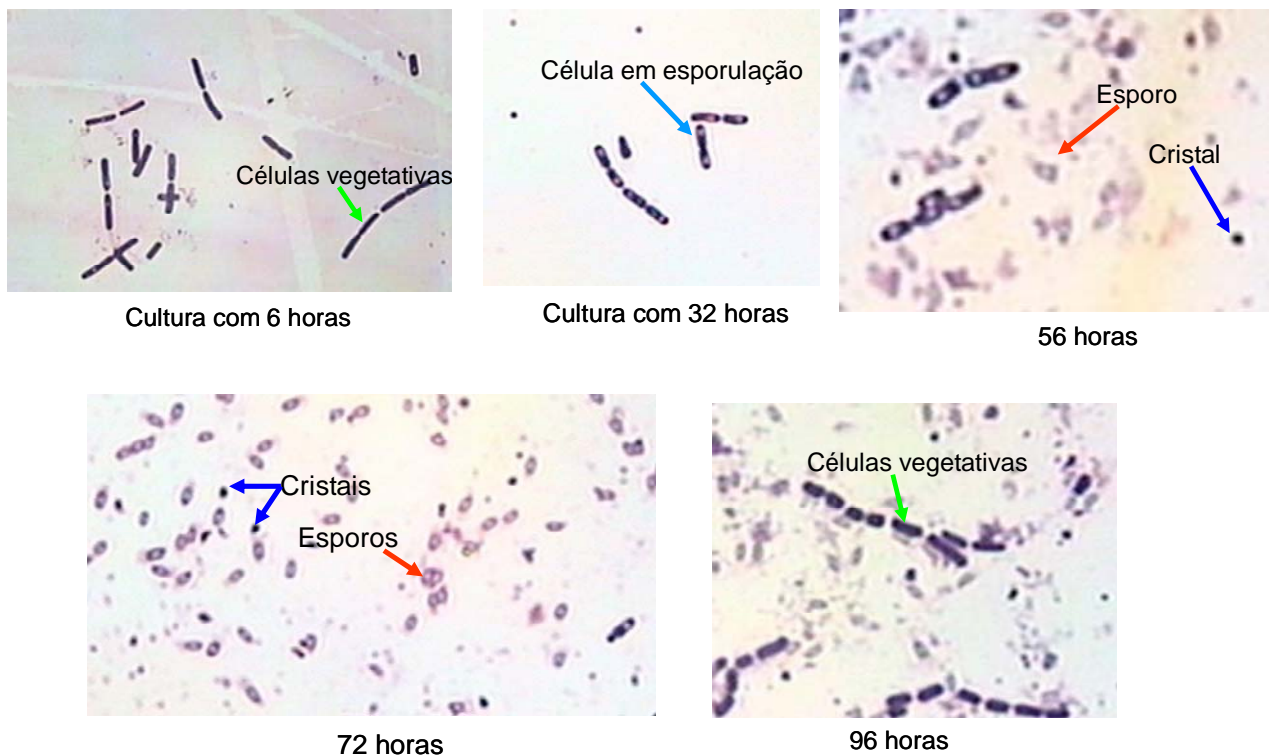


Figura 5.1. – Cultura de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* em diferentes momentos de cultivo. Aumento de 1000 vezes. Coloração: Amido-Black e Fucsina. Seta verde: células vegetativas. Seta azul clara: células em esporulação. Seta azul escura: cristais. Seta vermelha: esporos.

Analisando-se as fotomicroscopia, percebe-se que inicialmente predominavam células vegetativas (6 horas). Já com 32 horas de cultivo, a maior parte das lâminas apresentava células já em esporulação, com esporos e cristais no seu interior. Às 56 horas foi possível observar uma grande quantidade de esporos e cristais de toxina já no exterior da célula, porém ainda era evidente uma grande quantidade de células em esporulação. A cultura com 72 horas de cultivo apresentava praticamente apenas esporos e cristais fora das células, com poucas células em final de esporulação. Às 96 horas de cultivo, foi possível observar uma grande quantidade de cristais e esporos fora da célula, porém havia células vegetativas. Provavelmente, às 96 horas de cultivo, ocorreu a germinação de alguns esporos produzidos durante o cultivo, resultando novamente em algumas células vegetativas.

Pela análise da toxicidade observa-se que o período de 96 horas seria o indicado para o cultivo, porém, analisando-se as lâminas percebe-se que nesse momento alguns esporos já estariam germinando. A maior toxicidade do período de 96 horas provavelmente ocorreu porque a grande maioria das células da fase de crescimento já havia liberado seus cristais, ao passo que com 72 horas algumas células, ainda que poucas, apresentavam-se no final de esporulação. Uma alternativa para essa questão seria fermentar a cultura por 72 horas e, posteriormente mantê-la em repouso por 24 horas, para que as células em final de esporulação liberem suas toxinas. Dessa maneira, o tempo de cultivo não se estenderia muito, não resultando em custo extra para a produção. MORAES *et al.*(2001) relatam essa estratégia para alguns cultivos de *B. thuringiensis*.

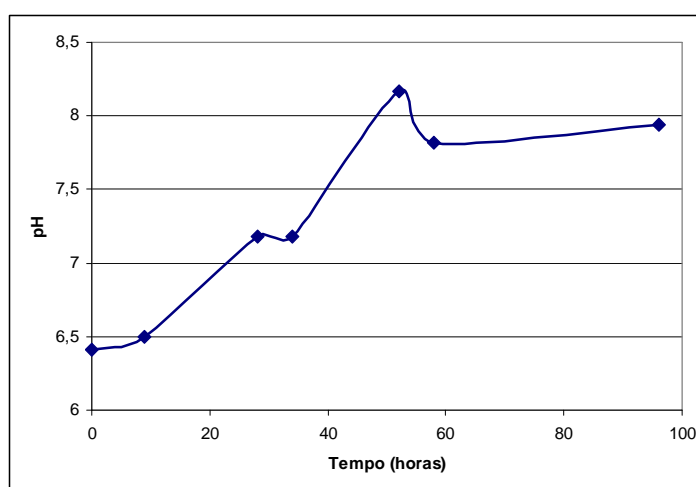


Gráfico 5.14 – Potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do cultivo (96 horas).

O Gráfico 5.14 apresenta os valores do potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do cultivo de 96 horas. Em geral, os valores de pH de uma cultura de *B. thuringiensis*, quando não há nenhum mecanismo de controle, iniciam em torno de 7.0, diminuindo para cerca de 6,0, no início da esporulação. Ao final da esporulação e com a lise celular o pH sobe para valores neutros e até básicos como 8.9 (ABDEL-HAMEED, 2001; LUNA *et al.*, 2004).

Nesse estudo, não se observou a queda inicial que, geralmente ocorre no cultivo de *B. thuringiensis*. Provavelmente, isso ocorreu devido a características do meio crisálida ou porque a concentração de glicose no meio era baixa (0,5g/L), o que resultou em menor produção de ácidos orgânicos responsáveis pela queda inicial do pH (CHANG, *et al.*, 2008). Além disso, os sais dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e fosfato de potássio dibásico anidro (K₂HPO₄) presentes no meio provavelmente tamponaram a variação de pH, o que dificultou a percepção dessa diminuição inicial. Posteriormente, o pH aumentou para cerca de 8,0 e manteve-se.

Os estudos de Öskan *et al.* (2003) sugerem o pH 7.0 com variação de ± 0.3 como melhor para o crescimento e a produção de toxinas por *B. thuringiensis*. Isso porque, algumas proteínas Cry, principalmente Cry4Ba, mostram-se mais sensíveis a variações de pH, com comprometimento pronunciado nos casos de alcalinização. Já os estudos de Içgen *et al.* (2002a) indicam uma melhor produção com pH entre 5,5 e 6,5. Outros estudos indicam que não há uma alteração significativa na produção de toxinas quando o pH do meio varia entre 6,5 a 8,0 (HOLMBERG, R, *et al.* apud. IÇGEN *et al.* 2002a); estes resultados corroboram com os dados observados neste trabalho.

5.4 TOXICIDADE DA CULTURA DE BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. ISRAELENسيس DURANTE ARMAZENAMENTO

O Gráfico 5.15 apresenta a toxicidade da cultura de *B. thuringiensis israelensis*, avaliada por meio de bioensaio com cálculo CL₅₀, por um período de 28 dias de armazenamento sob refrigeração (5 °C) e à condição ambiente (sem controle de temperatura).

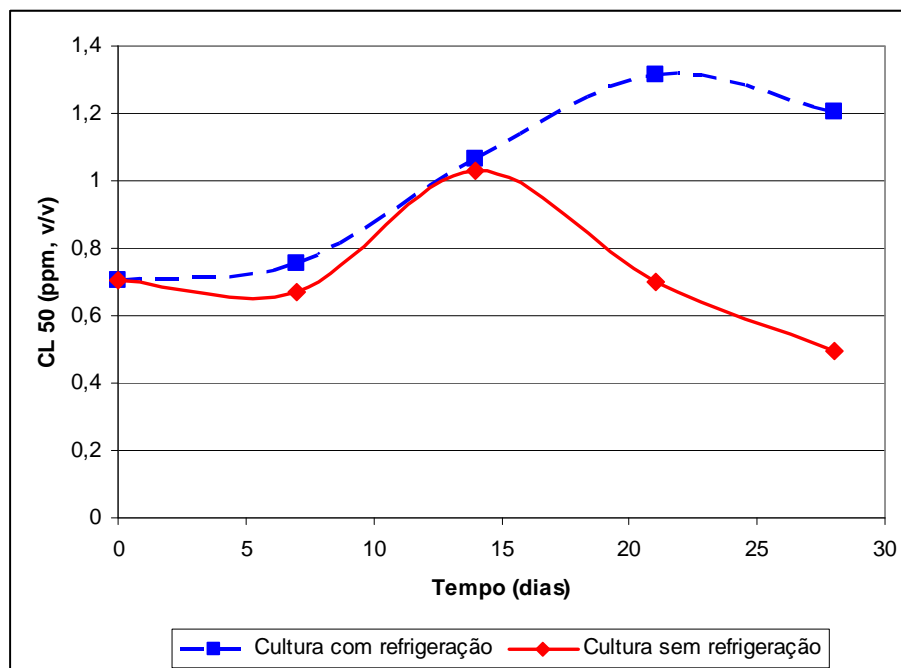


Gráfico 5.15 – Toxicidade da cultura durante o armazenamento.

Inicialmente o comportamento das duas culturas foi igual (cerca de 0,7ppm (v/v)). Os valores de CL₅₀ da cultura não refrigerada obtidos no 7º dia são menores do que o apresentado para o meio armazenado sob refrigeração, entretanto este índice aumenta no 14º dia evidenciando, uma diminuição da toxicidade para cerca de 1,0ppm (v/v). No entanto, com 21 e 28 dias de armazenamento, a cultura não refrigerada apresentou quedas na CL₅₀, chegando a 0,43ppm (v/v). Já a cultura refrigerada continuou a apresentar um aumento da CL₅₀ até 21 dias de armazenamento e, posteriormente, manteve-se em cerca de 1,20ppm (v/v). Portanto, o armazenamento à condição ambiente melhorou a toxicidade da cultura de 0,703 para 0,430ppm (v/v). Assim como nas demais etapas, durante este experimento foram feitas lâminas, a fim de se verificar a existência de contaminantes na cultura.

Geralmente, os estudos sobre armazenamento de *B. thuringiensis* apresentam dados apenas de produtos formulados (ARAÚJO *et al.*, 2007). No entanto, dados sobre o armazenamento da cultura são importantes, pois servem para se comparar com a eficiência do produto formulado e, assim, estabelecer a eficácia da formulação.

Glare e O'Callaghan, 2000 relatam que os principais fatores que influenciam a toxicidade de *B. thuringiensis* no meio ambiente são a radiação solar e

temperatura. Couch (2000) afirma que logo após a fermentação, é interessante manter a cultura a 4°C por algumas horas, para que ocorra a completa lise celular.

Nesse estudo, a melhor condição de armazenamento foi sem refrigeração. Provavelmente, a temperatura ambiente, pode ter possibilitado a lise de praticamente todas as células, resultando em uma maior toxicidade em relação à amostra armazenada em câmara fria. Esse resultado reforça aqueles obtidos por MORAES *et al.*, (2001), que demonstraram a importância de se deixar a cultura em repouso após sua fermentação, antes de formulá-la. No entanto, para resultados mais conclusivos, seria necessária a dosagem de proteínas Cry e quantificação de esporos durante o período de armazenamento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as fontes de nitrogênio estudadas (farinha de crisálida, peptona bacteriológica, uréia agroindustrial e sulfato de amônia), a farinha de crisálida e o sulfato de amônia foram os mais adequados para produção de toxinas por *B. thuringiensis israelensis* HD537.

Entre as fontes de carbono estudadas (sacarose, glicose e fécula de mandioca), a glicose apresentou-se a mais adequada para produção de toxinas.

A metodologia de superfície de resposta mostrou-se eficaz na otimização do meio de cultivo, resultando em um meio com as seguintes faixas de concentrações das fontes de carbono e nitrogênio: glicose 0,3 a 0,55g/L; farinha de crisálida 55 a 58g/L e sulfato de amônia 0,6 a 1,1g/L.

A otimização do meio alternativo à base de farinha de crisálida resultou em um meio com CL_{50} de 0,703ppm (v/v). Esse meio apresentou um custo 54,07 vezes menor do que o meio de cultivo Arcas adaptado.

As maiores toxicidades da cultura de *B. thuringiensis israelensis* HD537 ocorreram nas etapas finais de cultivo, sendo máxima em 96 horas.

O armazenamento da cultura de *B. thuringiensis israelensis* HD537 em ausência de refrigeração resultou em uma melhora na toxicidade (0,703 para 0,430ppm) da cultura após 28 dias, quando comparado com o armazenamento da cultura sob refrigeração, porém testes mais detalhados, como dosagem de proteínas Cry e quantificação de esporos, são necessários para corroborar este resultado.

Estudos posteriores visando otimizar as condições físicas de cultivo (pH, temperatura e aeração) utilizando a metodologia de superfície de resposta, são interessantes, visto que essas não foram objeto neste estudo. Além disso, pesquisas sobre o cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD537 envolvendo aumento de escala e sua formulação são de grande interesse.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, A. A stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modeling and scaling-up studies. World Journal of microbiology e Biotechnology, v.17, p.857-861; 2001.
- ADAMS, T. T, *et al.* Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. Bioresearch Technology, v. 82, p. 33-41; 2002.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? Journal of Bacteriology, v. 177, p.6027-6032, 1995.
- ALVES, L. F. A., *et al.*, Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grow in alternative media. Biocontrol Science and Technology, v. 7, p. 377-383, 1997.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: _____ (ed.) Controle microbiano de insetos,. Piracicaba: Manole, 1998. 1163p.
- ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, M. L. Crescimento bacteriano, In: TRABULSI, L R. *et al.* (ed.) Microbiologia, São Paulo: Atheneu, 3.ed, 1999. 586p.
- ANDRADE, E. Efeito dos nutrientes e inoculo na biossíntese dos cristais protéicos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Londrina, 2005, 39p.
- ARANTES, O. M. N. *et al* *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L., A. *et al* (org) Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: Agropecuária, 2002. p.269-293.
- ARAÚJO, A.P., *et al.* Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae). Biological Control. v. 41, p. 339-347, 2007.
- ARCAS, J.; YANTORO, O.; ERTOLA, R. A new medium for growth delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biotechnology Letters, v.6, n. 8, p. 495-500, 1984.
- ARCAS, J.; YANTORO, O.; ERTOLA, R. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnology Letters, v.9, n.2, p.105-110, 1987.

BARROS NETO, B. *et al.* Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Ed. da Unicamp, 1995, 300p.

BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* again mosquitoes and black flies. In: ENTWISTLE, P.F. *et al.* (ed) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Wiley, 1993. p.147-170.

BIZARRI, M. F. *et al.* Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium. Journal of Applied Microbiology, v. 104, p.60-9, 2008.

BRAR, S. K. *et al.* Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochemistry, v.46, p. 323-342, 2006.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends in Biotechnology v.26, n.10, p. 573-579, 2008.

BRAVO, A. *et al.* Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, v.49, p. 423-435, 2007.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. Aspectos da produção de *Bacillus thuringiensis*. In: Anais do congresso brasileiro de entomologia, Campinas. Fundação Cargill, 1988. p.70-80.

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

CHANG, M. *et al.*, Starch processing wastewater as a new medium for production of *Bacillus thuringiensis*. World J Microbiology and Biotechnology. v.24, p.441-7, 2008.

CHEN, S. *et al.* Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p.677-681, 2003.

COUCH Terry L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (org) Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications. Kluwer: Academic Publishes, 2000. p. 297-316.

CRICKMORE, N. *et al.* "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 24 dez. 2008.

CRICKMORE, N. *et al.* Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and molecular biology review, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

DEVI, P. S. V. *et al.* Barley-based medium for the cost-effective production of *Bacillus thuringiensis*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 21, p. 173-179, 2005.

FINNEY, D. J Probit Analysis. 3. ed. London: Cambridge Univ. Press, 1971.

GHRIBI, D. *et al.* Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. Journal of Applied Microbiology, v.98, p. 823-831, 2005.

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

GOLDEBERG, L. J.; MARGALIT J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex uinivatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News, v. 37, p. 355-358, 1977.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (coord) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Manole, 1986. p. 130-140.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (coord) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Manole, 1998. p. 383-446.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I Effects of mineral elements and pH. Research in Microbiology, v. 153, p. 599-604, 2002a.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II Effects of carbon and nitrogen sources. Research in Microbiology, v. 153, p. 605-609, 2002b.

JARIC'-PERKUSIC *et al.* Influence of Molting on Efficacy of Two Functionally Different Larvicides: *Bti* and *Temephos*. Journal of Economic Entomology, v. 101, n. 10, p. 1204-1210, 2008.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 23, p. 456-475, 1999.

LACHHAB, K. *et al.* Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewaters sludge as raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. Process Biochemistry. v.37. p. 197-208, 2002.

LERECLUS, D. *et al.* Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In ENTWISTLE, P.F. *et al.* (ed) *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Wiley, 1993. p.37-70.

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.

LUNA, C. L. *et al.*, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the Supernatant. Biotechnology Letters v. 26, p. 143–145, 2004.

MONTIEL, M. L. T. *et al.* Wastewaters treatment sludge a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Res., v. 35, n. 16, p. 3807-3816, 2001.

MORAES, I. O. *et al.* Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Manole, 1998. p. 815-844.

MORAES, I. O. *et al.*. Produção de bioinseticidas. In: LIMA. U.A. (coord.) Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. v 3. Porto Alegre: Edgar Blücher, 2001. p.245-265.

MORRIS, O. N. *et al.* Suitability of 30 agricultural products and by-products as nutrient sources for laboratory production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD133). Journal of invertebrate pathology. v. 70, p. 113-120, 1997.

NAIR, M. S.; DEAN, D. H., All Domains of Cry1A Toxins Insert into Insect Brush Border Membranes. The Journal of Biological Chemistry. v. 283, n. 39, p. 26324–26331, 2008.

OHBA, M. *et al.* "Parasporin nomenclature". Disponível em:
<<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>>. Acesso em: 30 dez. 2008.

OTIENO-AYAYO *et al.*, Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. Environmental Microbiology v.10, n. 9, p. 2191-2199, 2008.

ÖSKAN, M. *et al.* Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. Research in Microbiology, v.154, p.49-53, 2003

POOPATHI, S. *et al.* Development of low cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* World journal of Microbiology & Biotechnology, v.18, p.209-216, 2002.

PRABAGARAN, S. R. *et al.* Media optimization of *Bacillus thuringiensis* PBT-372 using response surface methodology. Chemistry, Biochemistry and Eng. Q., v. 18, n. 2, p. 183-187, 2004.

PRABAKARAN, G.; BALARAMAN, K. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Biological control, v. 36, p. 288-292, 2006.

PRABAKARAN, G. *et al.* Coconut water as a cheap source for the production of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. Acta Tropica v.105, p. 35–38, 2008.

RAYMOND, B. *et al.* Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. Journal of Invertebrate Pathology v.98 p. 307-313, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F., Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do pão, 2005. 326p.

RUSSEL, T. L.; KAY, B. H. Biologically based insecticides for the control of immature Australian mosquitoes: a review. Australian Journal of Entomology. v. 47, p. 232–242, 2008.

SALAMA, H. S.; MARGALIT, J. The use of *Bacillus thuringiensis israelensis* in development countries. In ENTWISTLE, P.F. *et al.* (ed) *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Wiley, 1993. p.237-254.

SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Review, v. 62, p. 775-806, 1998.

SUZUKI, Marise Tanaka; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. . . Fate of *Bacillus thuringiensis* in different insect larvae. Canadian Journal of Microbiology, Canada, v. 50, n. 11, p. 973-975, 2004.

TOKCAER, Z. *et al.* Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD 500. Process Biochemistry, v. 41, p. 350-355, 2006.

VALLEJO, F. *et al.* Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture. Biotechnology techniques, v. 13, p.279-281, 1999.

VALLETE-GELLY, I. *et al.* Bacterial strategies to overcome insect defenses. Nature reviews: Microbiology, v. 6, p. 302-313, 2008.

VIDAURRE, T. J. C. Estudos de otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de nova linhagem de “*Bacillus thuringiensis*”. 1996. 136p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

VIDYARTHI, A. S. *et al.* Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewaters sludge as a raw material. Water Research, v. 36, p. 4850-4860, 2002.

VILAS-BÔAS, L A. *et al.* Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in soil microcosm. FEMS Microbiology Ecology, v.31, n.3, p.255-259, 2000.

VILAS-BÔAS, G. T.; *et al.* Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. v. 53 p. 673-687, 2007.

VORA, D.; SHETNA, Y. I. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* in oil seed meal extract media contain cystine. World Journal of Microbioly & Biotechnology, v. 15, p. 747-749. 1999

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005, 39p.

WU, W. *et al.* Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production. Applied microbiology biotechnology, v.58, p.175-177. 2002.

YEZZA, A. *et al.* Wastewaters sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 21, p. 1165-1174, 2005.

YEZZA, A. *et al.* Bioconversion of industrial wastewaters and wastewaters sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1850-1857, 2006.

ZOUARI, N.; JAOUA, S. The effect of complex carbon, and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta- endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*. v.23, p.497-502. 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Processo de produção de farinha de crisálida pela indústria de fiação de seda Bratac S.A.

A matéria prima (casulos contendo as crisálidas do bicho da seda), após passarem pelo processo industrial de fiação automático e fiação semi-automático, são transportados através de canaletas para o setor de Sub-produtos, onde segue por meio de esteiras para a máquina estopadeira. Essa máquina faz a separação das crisálidas dos resíduos de seda.

A máquina estopadeira é dividida em esteira de entrada, tanque de banho com soda cáustica e vapor e dois tanques de enxágüe com água limpa.

Na esteira de entrada, um funcionário é responsável pela separação dos casulos que ainda podem ser reutilizados no setor de fiação automático e semi-automático, o restante do processo é todo automatizado.

As crisálidas seguem para os tanques de banho com solução de soda cáustica e vapor, por meio de esteiras. Esse processo tem por objetivo retirar os resíduos de seda.

Após a passagem pela solução de soda cáustica, as crisálidas seguem em esteira direto para o depósito da centrífuga, e em seguida, para a centrífuga. Após centrifugar, seguem em esteira para o secador de crisálidas.

No secador, as crisálidas permanecem por 1 hora, sendo a temperatura de 130°C no primeiro compartimento e 118°C no segundo compartimento. Após a secagem, as crisálidas são encaminhadas para o resfriador, onde serão resfriadas pelo processo de exaustão.

Após a secagem e resfriamento, as crisálidas seguem para a mesa de classificação. Nesse estágio de produção, é feito o exame da umidade das crisálidas. São realizadas duas amostras de locais diferentes na peneira rotativa e duas amostras dos sacos embalados, totalizando quatro amostras por turno, para monitoração da umidade para evitar possíveis falhas,

As crisálidas secas seguem para o silo de armazenamento ou moinho.

No silo de armazenamento, as crisálidas secas permanecem até o momento da embalagem como Crisálidas Integrais, ou seguem para o moinho, onde são trituradas e embaladas como Farinha de crisálida, de acordo com o pedido do cliente.

Fonte: Manual de Boas Práticas de Fabricação da empresa Fiação de seda BRATAC S.A.

ANEXO B – Soluções utilizadas na coloração das lâminas de *B. thuringiensis*

A solução de amido-black continha:

- Metanol (98%): 50 mL
- Ácido acético: 10,0 mL
- Amido-black: 1,5 g
- Água destilada: 40,0 mL

Após o preparo, a solução foi filtrada e estocada a 4 °C.

A solução de fucsina foi preparada a partir de duas soluções, denominadas I e II. A solução I continha:

- Fucsina básica: 1,0 g
- Metanol 95%: 10,0 mL

A solução II continha:

- Fenol: 5,0g
- Água destilada: 90,0 mL

As soluções I e II foram feitas separadamente e, posteriormente misturadas e filtradas. A solução de fucsina foi mantida a 4 °C e diluída a 30% no momento do uso.

ANEXO C – Análise da constituição química de farinha de crisálida.

RELATÓRIO DE ANÁLISES	
LABORATÓRIO CENTRAL – LABTEC	
FONE: (19) 227-9994 ou 729-4441	
Rua das Magnólias, 2405	
Jd Bandeirantes -CEP: 13050-070	
Campinas -SP Fax: (19)729-4443	
e-mail: labtec@guabi.com.br	
Data da análise: 15/04/2003	
Análise	Resultado
Proteína Bruta (%)	52.6600
Extrato Etéreo (%)	27.1700
Cálcio (%)	0.1100
Fósforo total (%)	0.6900
Alanina (%)	2.8214
Arginina (%)	2.7279
Ácido Aspártico (%)	5.8778
Glicina (%)	2.3481
Isoleucina (%)	2.1805
Leucina (%)	3.7528
Ácido Glutâmico (%)	6.7585
Lisina (%)	3.4737
Cistina (%)	0.6224
Metionina (%)	1.6891
Fenilalanina (%)	2.6662
Tirosina (%)	2.9083
Treonina (%)	2.6158
Triptofano (%)	0.6702
Prolina (%)	2.6552
Valina (%)	2.8380
Histidina (%)	1.5121
Serina (%)	2.6524
Potássio (Mg/Kg)	7643.0900
Magnésio (Mg/Kg)	3266.7500
Manganês (Mg/Kg)	não detectado
Zinco (Mg/Kg)	162.290
Ferro (Mg/Kg)	89.1100
Cobre (Mg/Kg)	14.6500
Cobalto (Mg/Kg)	8.5000