

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EDPO VINICIUS DE OLIVEIRA**

**OBTENÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO  
MILHOCINA COMO SUBSTRATO**

**DISSERTAÇÃO**

**PONTA GROSSA**

**2019**

**EDPO VINICIUS DE OLIVEIRA**

**OBTENÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO  
MILHOCINA COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Quintino Pereira Marchesi

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sabrina Ávila Rodrigues

**PONTA GROSSA**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca  
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa  
n.67/19

O48 Oliveira, Edpo Vinicius de

Obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* utilizando milhocina como substrato. /  
Edpo Vinicius de Oliveira, 2019.  
75 f.; il. 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Quintino Pereira Marchesi  
Coorientadora: Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

1. Resíduos agrícolas. 2. Milho. 3. Fermentação. 4. Inseticidas. 5. *Bacillus thuringiensis*. I. Marchesi, Luis Fernando Quintino Pereira. II. Rodrigues, Sabrina Ávila. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 606.6



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS PONTA GROSSA  
*Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação*  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PPGBIOTEC**  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 5/2019

### OBTENÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO MILHOCINA COMO SUBSTRATO

Por

Edpo Vinicius de Oliveira

Esta dissertação foi apresentada às **14** horas de **05 de julho de 2019**, na sala **DIRPPG**, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula de Azevedo  
Pasqualine (UNOPAR)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Vitória Messias  
Bittencourt (UTFPR)**

---

**Prof. Dr. Luis Fernando Quintino  
Pereira Marchesi (UTFPR)**  
*Orientador e presidente da banca*



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Vitória Messias  
Bittencourt**  
Coordenadora do PPGBIOTEC  
UTFPR – Câmpus Ponta Grossa

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, por me apoiar em minhas decisões e acreditar em meus sonhos.

À SuperBac por ter cedido a estrutura para realizações dos experimentos.

À Dr<sup>a</sup> Caroline Didier pelo apoio e companheirismo, além da paciência durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Vitória Messias Bittencourt pela orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sabrina Ávila Rodrigues pela coorientação e ensinamentos durante todo o trabalho.

À UTFPR Campus Ponta Grossa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, meus singelos agradecimentos.

## RESUMO

OLIVEIRA, Edpo Vinicius de. **Obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* utilizando milhocina como substrato.** 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

O presente estudo consiste em otimizar um processo fermentativo direcionado para a obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* (Bti) visando sua comercialização como bioinseticida, através da fermentação de substratos disponíveis na Região Centro-Norte do Estado do Paraná. A milhocina possui potencial como fonte alternativa de substrato para a realização de processos fermentativos para a obtenção de esporos de Bti. Foram conduzidos experimentos avaliando a latente deste resíduo em conjunto com outras fontes de nitrogênio e carbono conceituadas, tal como extrato de levedura, sulfato de amônio e glicose. Além das provas com cada um dos ingredientes isoladamente em relação ao meio de cultura Trypticase Glucose Levedura (TGY) padrão, foi realizado um delineamento composto central, na qual foi analisado as fontes alternativas de nitrogênio em conjunto com concentrações de glicose, devido seu comportamento e reatividade esperados serem notórios durante o processo fermentativo. É tecnicamente possível otimizar o processo fermentativo para a obtenção de esporos de Bti a partir da fermentação utilizando a milhocina. A otimização do experimento resultou em um meio com as seguintes faixas de concentrações das fontes de carbono e nitrogênio: glicose 1g/L; extrato de levedura 2g/L; milhocina 40 g/L e sulfato de amônia 5 g/L. O resíduo milhocina apresenta grande potencial técnico para ser utilizado como fonte de nitrogênio e carbono em processos fermentativos.

**Palavras-chave:** Milhocina. Resíduo agroindustrial. Fermentação. *Bacillus*. Bioinseticida.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Edpo Vinicius de. **Obtaining *Bacillus thuringiensis* spores using millocin as substrate.** 2019. 75 p. Thesis (Master's Degree in Biotechnology) – Federal University of Technology - Paraná, Ponta Grossa, 2019.

The present study consists in optimizing a fermentation process directed to obtain *Bacillus thuringiensis* (Bti) spores aiming its commercialization as bioinsecticide, through the fermentation of available substrates in the Center-North Region of Paraná State. Millocin has potential as an alternative substrate source for fermentation processes to obtain Bti spores. Experiments were conducted to evaluate the latent of this residue in conjunction with other reputable nitrogen and carbon sources, such as yeast extract, ammonium sulfate and glucose. In addition to testing the individual ingredients for the standard Trypticase Glucose Yeast (TGY) culture medium, a central composite design was performed in which alternative nitrogen sources in conjunction with glucose concentrations were analyzed for their behavior and reactivity expected to be noticeable during the fermentation process. It is technically possible to optimize the fermentation process to obtain Bti spores from fermentation using millocin. The optimization of the experiment resulted in a medium with the following concentration ranges of carbon and nitrogen sources: glucose 1g / L; yeast extract 2g / L; 40 mg / L millocin and 5 g / L ammonium sulfate. The millocin residue has great technical potential to be used as a source of nitrogen and carbon in fermentation processes.

**Keywords:** Millocin. Agroindustrial waste. Fermentation. *Bacillus*. Bioinsecticide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Região Centro-Norte do Paraná. ....	15
Figura 2- Mecanismo de ação de <i>Bacillus thuringiensis</i> na membrana do epitélio intestinal de larvas de insetos. ....	25
Figura 3- Biorreator de 150 L para realização de experimentos em escala piloto. ....	34
Figura 4- Esquema representativo das etapas experimentais realizadas para desenvolvimento do meio de cultura otimizado.....	41



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Artigos publicados e divididos por subáreas de pesquisas com o termo “bioinseticidas” na base de dados Scopus em 2019. ....	13
Gráfico 2- Número de artigos publicados por ano com o termo “bioinseticida” nas palavras-chave na base de dados Scopus. ....	14
Gráfico 3- Contribuição das principais culturas com a produção de grãos no Brasil. ....	12
Gráfico 4- Evolução da área plantada e da produção brasileira de grãos. ....	13
Gráfico 5- Curva de calibração da concentração celular. ....	42
Gráfico 6- Avaliação da concentração celular dos experimentos (DCC 2 <sup>4</sup> ) realizados em Erlenmeyer, utilizando valores preditos em função dos valores experimentais obtidos. ....	45
Gráfico 7- Velocidade específica máxima de crescimento bacteriano. ....	46
Gráfico 8- Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos para crescimento celular obtidos por <i>Bacillus thuringiensis</i> . ....	48
Gráfico 9- Superfície de resposta plana do crescimento celular com as variáveis glicose e milhocina. ....	49
Gráfico 10- Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos para esporulação obtidos por <i>Bacillus thuringiensis</i> . ....	51
Gráfico 11- Superfície de resposta plana para taxa de esporos (%), com as variáveis glicose e milhocina. ....	52
Gráfico 12- Monitoramento da concentração celular de Bti em fermentador piloto ...	54
Gráfico 13- Controle do processo no fermentador piloto. ....	55
Gráfico 14- Monitoramento do oxigênio dissolvido no fermentador piloto. ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição típica da água de maceração (milhocina).....	29
Tabela 2- Componentes dos micronutrientes inalterados nos delineamentos experimentais. ....	31
Tabela 3- Níveis utilizados com suas respectivas concentrações.....	31
Tabela 4- Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central (DCC) 2 <sup>4</sup> , com valores codificados e reais para o estudo dos efeitos de glicose, sulfato de amônia, extrato de levedura e milhocina no crescimento de Bti. ....	32
Tabela 5- Resultados do Delineamento Composto Central, com 3 pontos centrais para otimização de Bti .....	43
Tabela 6- Análise de variância dos resultados para a resposta de crescimento celular. Nível de significância (P<0,05). ....	48
Tabela 7- Análise de variância dos resultados para a resposta contagem de esporos (%) dos efeitos de concentração do meio. ....	51
Tabela 8- Análise comparativa entre os resultados obtidos para os diferentes processos fermentativos.....	57
Tabela 9- Análise econômica comparativa entre os meios de cultivo adaptado e otimizado com milhocina. ....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
3.1 AGROINDUSTRIA BRASILEIRA .....	12
3.1.2 Região Centro-Norte Do Paraná .....	14
3.2 CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS.....	16
3.3 CONTROLE BIOLÓGICO COM BTI .....	19
3.3.1 Caracterização Microbiológica .....	20
3.3.2 Proteínas Inseticidas .....	21
3.3.3 Mecanismos De Ação.....	23
3.3.4 Produção De Bti Em Escala Industrial.....	26
3.4 Resíduos Agroindustriais.....	27
3.4.1 Milhocina .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 MICRORGANISMO .....	30
4.2 FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO DE BTI.....	30
4.3 RECUPERAÇÃO E MANUTENÇÃO DO BANCO DE CEPAS.....	33
4.4 PREPARO DO INÓCULO .....	33
4.4.1 Ensaio Em Erlenmeyer .....	33
4.4.2 Ensaio Em Biorreator .....	34
4.5 MONITORAMENTO DOS PARAMETROS FERMENTATIVOS .....	35
4.5.1 Produtividade Em Células .....	36
4.5.2 Velocidade Específica De Crescimento.....	36
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	37
4.6.1 Coleta De Amostras .....	37
4.6.2 Lâminas Para Análise Microscópica.....	37
4.6.3 Concentração Celular.....	38
4.6.4 Contagem De Células E Esporos.....	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39

4.8 SEQUENCIAL EXPERIMENTAL.....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1 VALIDAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	42
5.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO de BTI (erlenmeyer)..	43
5.4 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA DO MICRORGANISMO .....	46
5.5 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO CELULAR.....	47
5.6 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO NA TAXA DE ESPORULAÇÃO.....	50
5.7 AVALIAÇÃO DO CULTIVO EM FERMENTADOR PILOTO .....	53
5.8 ANÁLISE ECONÔMICA DO MEIO DE CULTIVO OTIMIZADO .....	57
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos relacionados ao controle de insetos responsáveis de proliferar doenças e prejudicar a agricultura são amplamente divulgados e apresentam uma importância relevante na economia e saúde humana (CERLETTI et al., 2017). Dessa forma, o uso extensivo de pesticidas e/ou inseticidas químicos sintéticos é largamente exigido para o desenvolvimento de atividades agrícola e prevenção de doenças em ambientes urbanos (RIZVI et al., 2018).

Entretanto, a utilização de defensivos sem o cuidado necessário como: pesticidas, praguicidas, biocida e agroquímicos, contribuem para a degradação ambiental e o aumento das intoxicações ocupacionais, sendo um dos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; MADEJ et al., 2018). O Brasil é considerado por décadas como o maior consumidor e produtor de agrotóxicos do mundo (FARIA et al., 2007; PIGNATI et al., 2017). Porém, segundo levantamento recente da Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil é o terceiro maior produtor de óleo de soja e o principal fornecedor mundial de carne de aves e farinha de trigo (FAO, 2018).

Devido à importância do Brasil como fornecedor de insumos primários no cenário internacional, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA, preocupado em estabelecer um controle do uso desses defensivos agrícolas, elaborou um estudo no ano de 2013 a 2015 examinando os principais alimentos utilizados na dieta nacional e foi apontado que vinte por cento dos alimentos examinados apresentaram o uso de pesticidas com concentração acima do limite de resíduos que permanecem nas culturas após a aplicação dos agrotóxicos (ANVISA, 2016).

Considerando o impacto negativo que os pesticidas causam tanto ao meio ambiente e as pessoas que consomem esse tipo de alimentação, vários estudos são empregados para desenvolver forma alternativa para o controle de insetos (HYVÄRINEN et al., 2006). Um exemplo, é o "*Insect trapping methods*" que empregam mecanismos de captura de insetos utilizando armadilhas com feromônios artificiais femininos para atrair o macho, interceptação de voo, armadilhas suspensas livre, armadilhas de queda posicionadas no solo e armadilhas de interceptação de voo presas a troncos (ANGUELOV et al., 2016).

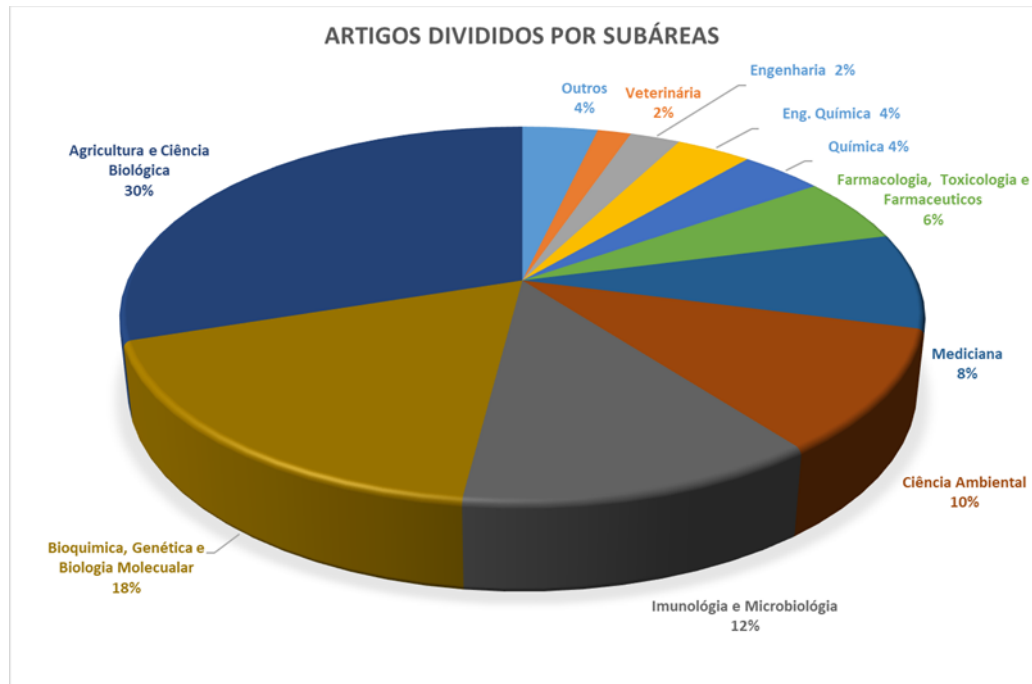
Este tipo de prevenção é interessante, porque não apresenta toxicidade por resíduos químicos para controlar a população de insetos, mas o processo de amostragem e desenvolvimento tem muitas variáveis como tipos de armadilhas e avaliação dos dados estatísticos que dificultam os estudos. Outra desvantagem é que os resultados observados nesse tipo de estudos são eficazes para fornecer uma contagem relativa que permitem comparações, mas pobres em fornecer informações sobre o tamanho absoluto da população inseto (PETROVSKII et al., 2012).

Outra defesa agrícola muito presente no controle de praga é a ação de inimigos naturais (ou Manejo Integrado de Pragas, MIP-Embrapa), que se dividem em insetos predadores e parasitoides. Esse tipo de mecanismo age com um regulador da densidade populacional dos insetos-pragas, mas esse processo onde utilizam agentes bióticos dependem intimamente das condições climáticas e do manejo de pragas adotado em cada lavoura (CONTE et al., 2014). Esse procedimento de defesa tem como principal característica evitar aplicação de inseticidas e diminuindo a mortalidade de polinizadores, e diminuir a evolução das resistências por parte dos insetos-pragas a moléculas de inseticida.

Em adição a esse assunto de mecanismo de defesa contra problemas agrônômicos, a utilização de bioinseticidas torna-se uma ferramenta poderosa para o controle de insetos-pragas apresentando uma variedade de estudos em diversas áreas do conhecimento - Figura 1 (SCOPUS, 2018). Quando utilizado o termo bioinseticida em base de bancos de dados, observamos que o primeiro artigo publicado foi em 1977, onde foi relatado o papel de agentes microbiológicos no controle de vetores (ARATA et al., 1977). Neste documento de pesquisa os autores descreveram a importância da utilização de microrganismos como vetores no controle de pragas, mas citava que nesta época o interesse industrial nesses agentes não era expressivo.

Porém, mesmo apresentando resultados positivos o controle biológico de pragas possui algumas dificuldades para empregar essa tecnologia na lavoura (PEFEROEN, 1997). Dentre elas, destacam-se: a dificuldade para a aceitação destes produtos “antinaturais” pelos consumidores, preocupações com biossegurança em mamíferos e impacto ecológicos desta classe de bioinseticidas (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Existem outros tipos de mecanismo de ação que estão relacionados com o estudo de bioinseticidas, por causa do amplo espectro de possíveis aplicações dessa ferramenta em diversas áreas (Gráfico 1).

**Gráfico 1-** Artigos publicados e divididos por subáreas de pesquisas com o termo “bioinseticidas” na base de dados Scopus em 2019.



**Fonte:** o autor.

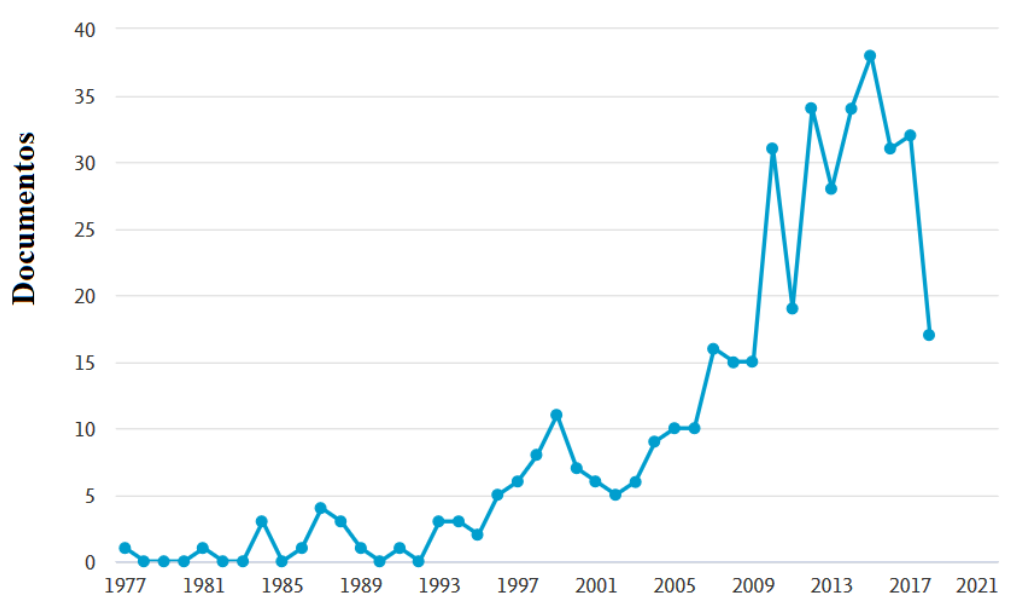
A utilização de métodos biológicos como a utilização de bactérias como *Bacillus turingiensis* e *Bacillus sphaericus* capazes de produzir endotoxinas apresentaram resultados promissores frente a larvas de lepidópteros e coleópteros (ALBEROLA *et al.*, 2008). Uma estratégia de ação empregando esta tecnologia é a utilização de expressão de proteínas de defesa endógenas, introdução de gene de controle de insetos derivados de plantas, conferindo resistências a insetos e patógenos (BOLTER; JONGSMA, 1995).

O mecanismo de ação para essa ferramenta de controle está baseado em ingestão das toxinas pelo inseto, que se dissolvem no intestino. Essas toxinas são ativadas por proteases intestinais, ligadas a receptores na membrana celular epitelial e inseridas na membrana. As toxinas inseridas formam poros como oligômeros. As células são lisadas, o inseto deixa de se alimentar o que leva à sua morte (ALBEROLA *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2010).

Pode-se observar no Gráfico 2, que estudos relacionados a esse termo permaneceu estático por quase dez anos. No entanto, no Século XX o interesse sobre esse assunto aumentou, esse comportamento pode estar relacionado com a evolução da ciência e a exigência por novas ferramentas para o controle de insetos/pragas,

identificação de doenças relacionadas ao uso de produtos químicos prejudiciais a vida humana e para atender às demandas por alimentos da população mundial (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002).

**Gráfico 2-** Número de artigos publicados por ano com o termo “bioinseticida” nas palavras-chave na base de dados Scopus.



**Fonte:** o autor.

Desta forma, o presente estudo possui o objetivo de otimizar um processo fermentativo direcionado para a obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* visando sua comercialização como bioinseticida, através da fermentação de resíduos agroindustriais alternativos disponíveis na Região Centro-Norte do Estado do Paraná.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar um processo fermentativo direcionado para a obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* visando produtividade como bioinseticida, através da fermentação de resíduos agroindustriais alternativos disponíveis na Região Centro-Norte do Estado do Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficiência da milhocina com outras fontes de nitrogênio comerciais bem estabelecidas para o cultivo de *Bacillus thuringiensis*, tais como sulfato de amônio, extrato de levedura;
- Determinar os parâmetros cinéticos do processo fermentativo conduzido à base de milhocina;
- Otimizar as variáveis dos processos fermentativos para a obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis* via fermentação submersa;
- Analisar a viabilidade de se utilizar o resíduo de milhocina como fonte de nutriente para a produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* na região de estudo.

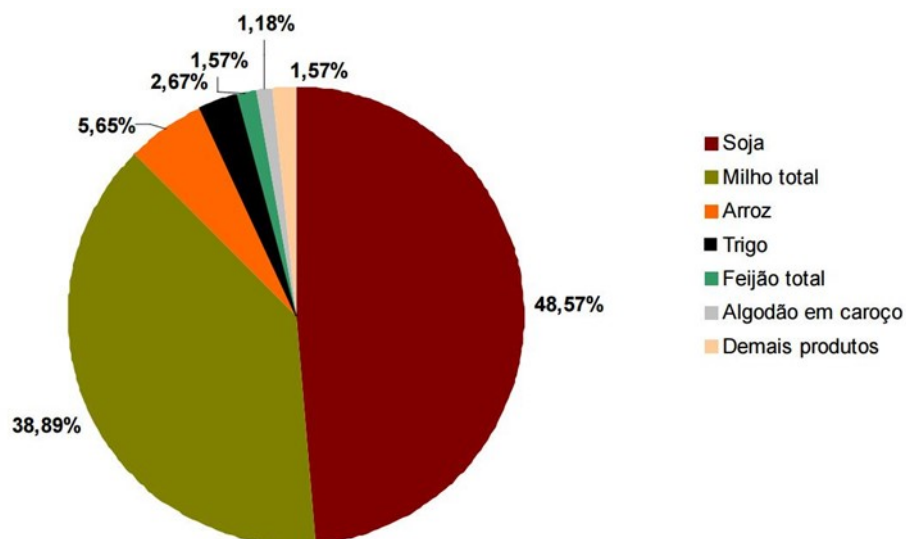
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 AGROINDUSTRIA BRASILEIRA

A agricultura é a principal força da economia brasileira, respondendo por um terço da riqueza gerada no país. Este setor é responsável por mais de 40% do Produto Interno Bruto (PIB) e das exportações totais, além de empregar mais de 18 milhões de trabalhadores (ABILOGÁS, 2015). Segundo o IBGE (2015), o Brasil possui 850 milhões de hectares em seu território, dentre os quais o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA (2016) estima que cerca de 350 milhões sejam agriculturáveis. As monoculturas de cana-de-açúcar e soja ocupam, respectivamente, em torno de 22 milhões e 8 milhões de hectares (MAPA, 2015).

Apesar das adversidades climáticas que atingiram importantes regiões de produção agrícola em 2014, o Brasil atingiu uma produção de 193,5 milhões de toneladas de grãos, sendo o segundo maior percentual oriundo do milho (38,89%) e o maior oriundo da soja (48,57%), contribuindo para que o país se destaque entre os maiores produtores e exportadores de soja do mundo (CONAB, 2017) - Gráfico 3.

Gráfico 3- Contribuição das principais culturas com a produção de grãos no Brasil.

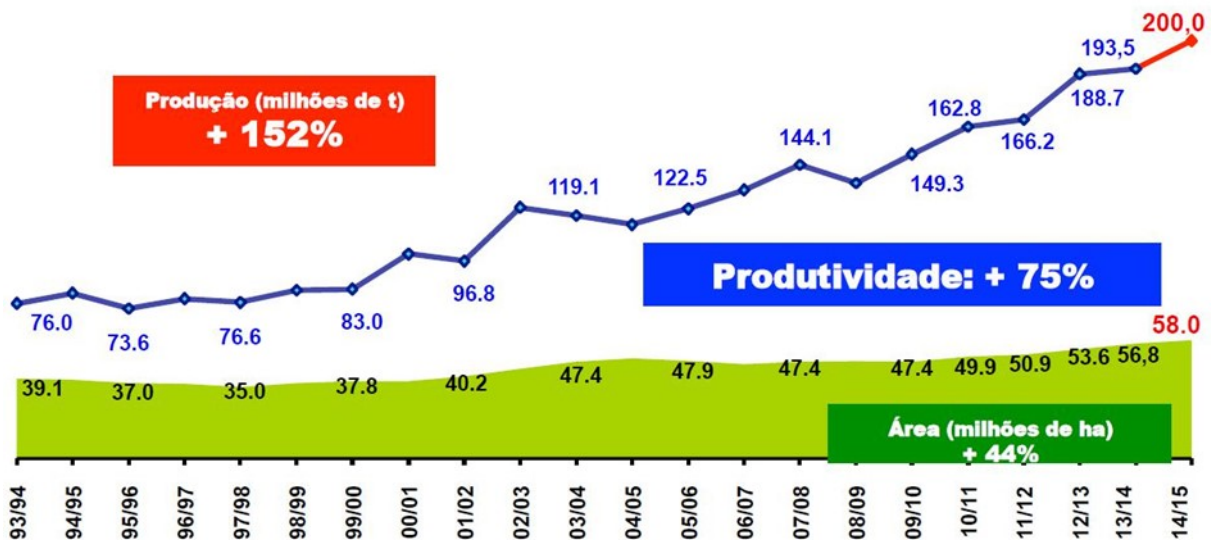


Fonte: CONAB (2017).

A partir de 1970, a geração, a adaptação, a transferência e a adoção de inovações tecnológicas possibilitaram ganhos de produtividade expressivos, principalmente no setor de grãos, cuja produção duplicou. Segundo dados do MAPA (2013), o desempenho interno e externo da pecuária, assim como o do agronegócio (constituído por agroindústrias que se abastecem da atividade agropecuária), cujas exportações em 2013 atingiram a cifra recorde de US\$ 100 bilhões, tem contribuído de forma relevante para a estabilidade e crescimento da economia.

Dados do Plano Agrícola e Pecuário 2014/2015, elaborado pelo MAPA (2015) mostram que a produção brasileira de grãos mais que dobrou em duas décadas, sendo que neste período a taxa de crescimento da produtividade (3,2%) foi quase duas vezes superior à da área (1,7%) - Gráfico 4.

Gráfico 4- Evolução da área plantada e da produção brasileira de grãos.



Fonte: MAPA (2015).

O crescimento da produção do setor agropecuário brasileiro, medido pelo valor bruto da produção, está relacionado fundamentalmente aos ganhos de produtividade, às condições brasileiras favoráveis (recursos naturais abundantes, grande dimensão territorial, condições meteorológicas, etc.) e ao aprimoramento de políticas públicas agrícolas, voltadas especialmente, para as áreas de infraestrutura e logística e de apoio à comercialização e crédito rural, que abrangem maior disponibilidade de

recursos, elevação dos limites de financiamento de custeio, taxas de juros inferiores às do mercado e a criação de novos programas de investimento.

O estado que se destacou com maior índice de produtividade na safra 2014/2015 foi Mato Grosso (24,74%), seguido por Paraná (18,08%) e Rio Grande do Sul (14,34%) (CONAB, 2017), que apresenta a produção total de grãos por UF na safra 2014/2015. Prevê-se também expansão da área plantada de soja de 32,2 para 44,6 milhões de ha, o que será suficiente para comportar a safra de 165 milhões de toneladas em 2030 (ABIOVE et al., 2016).

Além disso, houve um grande avanço no desenvolvimento de tecnologias que permitiram ao produtor rural aumentar o desempenho de suas atividades. O uso da tecnologia tende, geralmente, a alterar o sistema de produção, tornando-o mais eficiente e rentável (GIANETTI et al., 2013). Esse crescimento tecnológico do setor se deve, principalmente, à incorporação de equipamentos e de áreas plantadas ao processo produtivo. A adoção de novas técnicas e o processo de modernização que ocorreram com mais intensidade depois de 1970, em função do avanço tecnológico e das políticas governamentais, e principalmente do crédito rural orientado (CONAB, 2017), permitiram a atual configuração do cenário agropecuário brasileiro.

Conseqüentemente, os significativos avanços no desempenho do agronegócio, implicaram no aumento do consumo de insumos e da geração de resíduos nas atividades agropecuária e agroindustrial (ROSA et al., 2011). Os resíduos são gerados ao longo de todas as cadeias produtivas, e seu reuso varia de acordo com características da matéria-prima disponível, tais como a espécie, o produto, o grau de processamento, a eficiência do processo de transformação já empregado, tipos de equipamentos e máquinas disponíveis, número de operações do processamento, a qualificação da mão-de-obra e demais exigências mercadológicas (ABIB, 2012).

### 3.1.2 Região Centro-Norte Do Paraná

De acordo com dados do IPARDES (2018), a Região de Londrina (norte do estado, a 380 km da capital, Curitiba) é a 2ª mais populosa do Paraná e a 4ª da Região Sul do Brasil – Figura 1. Além do escoamento de grãos, também faz uma importante interligação dos estados do Sul com São Paulo e daí ao Sudeste; e com Mato Grosso do Sul e daí ao Centro-Oeste. Nesta região a última safra foi a maior da história,

embora tenham ocorrido problemas pontuais de má-distribuição de umidade, que prejudicaram lavouras e reduziram a produtividade em vários municípios, notadamente Paiçandu e Floraí, na região de Maringá; Jussara, vizinho a Cianorte; Iporã, nas imediações e Umuarama, e alguns próximos a Londrina.

Figura 1- Região Centro-Norte do Paraná.



Fonte: IPARDES (2018).

Em geral, o clima também foi favorável a produção de milho de inverno e soja no verão, cuja produtividade regional poderia ter sido maior não fosse uma estiagem ocorrida entre maio e junho (IPARDES, 2018). A razão da potencialidade dessa área são suas características essenciais para a agricultura moderna (IBGE, 2017). A limitação maior, no entanto, são as precárias condições de logística, especialmente transporte terrestre e portuário, em algumas áreas, ausência de comunicação (MAPA, 2016).

### 3.2 CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS

Na tentativa de defender as plantações de pragas e doenças, e garantir índices de produtividade que proporcionem retornos econômicos, os agrotóxicos têm sido amplamente utilizados, no entanto, seu uso abusivo tem causado grandes danos, levando à emergência de populações resistentes e à eliminação de inimigos naturais, além de contribuir para a contaminação do ambiente e prejuízo à saúde de agricultores e população em geral (RÜEGG et al., 1991).

Agrotóxicos são produtos utilizados na agricultura para controlar doenças, insetos ou plantas daninhas que possam causar danos às plantações. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, atualmente existem cerca de 15000 formulações para 400 agrotóxicos diferentes em todo o mundo, sendo que cerca de 8000 encontram-se licenciados no Brasil, que é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. Os mais utilizados no país são herbicidas e inseticidas e de acordo com os últimos dados consolidados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, 2016), no ano de 2012 foram vendidos no Brasil 823 mil toneladas de agrotóxicos, o que movimentou um valor de US\$ 9,7 bilhões.

O Brasil sendo um dos maiores produtores de alimentos, algodão, madeira, celulose e biocombustível, também é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, posição que ocupa há oito anos consecutivos (MAPA, 2017). Na safra agrícola de 2012 foram pulverizados, nos seus 95 milhões de hectares de lavouras, cerca de 1,05 bilhões de litros de herbicidas, inseticidas e fungicidas, principalmente nos cultivos de soja, milho, cana de açúcar, algodão, cítricos, café e hortaliças (PIGNATI et al., 2014). O maior problema no uso destes produtos está no mau manejo realizado pelos agricultores, onde estes podem trazer problemas para a saúde humana e animal, como também para o meio ambiente.

A degradação do meio ambiente tem consequências em longo prazo e seus efeitos podem ser irreversíveis. Segundo Veiga et al. (2006), a aplicação de agrotóxicos pode contaminar o solo e os sistemas hídricos, culminando numa degradação ambiental que teria como consequência prejuízos à saúde e alterações significativas nos ecossistemas. De acordo com Pignati et al. (2014), dentre os vários impactos da cadeia produtiva do agronegócio, os de maior relevância para a saúde do trabalhador, da população e do ambiente são as poluições e intoxicações agudas

e crônicas relacionadas aos agrotóxicos. Com essa dependência dos agroquímicos os fazendeiros, ao pulverizarem esses venenos, contaminam a lavoura, o alimento, o meio ambiente, os trabalhadores e a população do entorno, com o objetivo de atingir o alvo ou as "pragas da lavoura" (inseto, fungo ou erva daninha) que se desenvolvem dentro das plantações.

O meio ambiente é amplamente afetado pelo uso de agrotóxicos. As características tóxicas de uma substância ou composto químico são avaliadas por experimentação em animais de laboratório. A avaliação toxicológica do produto permite a detecção de possíveis efeitos graves para a saúde que possam impedir o registro e a utilização de um determinado praguicida. De acordo com Ferrari (1986) as terras carregadas pelas águas das chuvas levam para os rios, lagoas e barragens, os resíduos de agrotóxicos, comprometendo a fauna e a flora aquática, além de comprometer as águas com a finalidade de abastecimento.

A busca por pesticidas que diminuam o uso de inseticidas químicos tem sido feita em todo o mundo, com a finalidade de reduzir a poluição e os impactos causados ao meio ambiente. Além disso, os pesticidas podem interferir no equilíbrio ecológico, possibilitando então o surgimento de insetos resistentes (LIMA, 2010), ou seja, selecionando os insetos que possuem tolerância genética a determinados agentes químicos. Como alternativa aos agrotóxicos tem se destacado o uso do controle biológico de insetos, que consiste na utilização de um inimigo natural (predadores, parasitoides ou patógenos) para combater as pragas e vetores de doenças em culturas agrícolas (KUMAR et al., 2008).

Na agricultura, o controle biológico tem obtido grandes avanços, visando a preservação das plantações e salvaguarda da produção de alimentos mediante a substituição dos pesticidas químicos por outros de fonte biológica, tais como bactérias, fungos e vírus entomopatogênicos (MALAJOVICH, 2012). O controle biológico pode ser definido como um fenômeno natural que consiste na regulação populacional de plantas e animais por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica do ecossistema (PARRA et al., 2002).

O controle microbiano de insetos utiliza microrganismos patogênicos isolados de insetos doentes durante epidemias que ocorrem naturalmente. Estes microrganismos produzem certas toxinas (esporos, células ou outros produtos) durante seu desenvolvimento e estas apresentam algumas atividades entomopatogênicas. O controle biológico de pragas reduz os riscos ambientais e de

saúde, provenientes do uso de produtos químicos, podendo ser utilizados em plantações para que os níveis populacionais de pragas não atinjam níveis danosos.

O uso de bioinseticida proporciona alta especificidade, ou seja, somente causa danos a praga alvo, não afetando outros insetos, plantas ou até mesmo animais. Em pesquisas realizadas visando identificar compostos capazes de apresentar ação inseticida, foi descrito que os metabólitos secundários na forma de compostos fenólicos, quinonas, cumarinas, terpenoides, alcaloides, polifenóis, flavonas, taninos, polipeptídeos são capazes de apresentar atividade inseticida para grupos de insetos específicos (FERNANDES et al., 1996; COWAN, 1999).

O crescente interesse pela utilização de bactérias entomopatogênicas para o controle de populações de insetos prejudiciais levou o homem a pesquisar mais profundamente as bactérias esporulantes. Nos Estados Unidos, o primeiro agente microbiológico para controle de pragas (*Bacillus popilliae*) foi registrado em 1948 pelo Departamento de Agricultura daquele país. Porém, até 2007, os Estados Unidos registraram cerca de 84 ingredientes biológicos-ativos compondo em torno de 262 produtos à base de microrganismos (OLIVEIRA-FILHO, 2008).

Um dos bioinseticidas mais conhecidos em todo o mundo é o *Bacillus thuringiensis*, descrito em 1915 na Alemanha. Esta bactéria foi isolada a partir de traça de farinha (*Anagasta kuehniella*). O primeiro produto comercial a base dessa bactéria, chamado Sporeine® estava disponível somente em 1938 na França. Somente em 1957 foi produzida a primeira formulação comercial de *Bacillus thuringiensis* (ÂNGELO et al., 2010; VILAS-BOAS et al., 2012).

As espécies do gênero *Bacillus* são representadas por células em forma de bastonete, às vezes em cadeia, a maioria capaz de produzir endósporo. O gênero *Bacillus* é composto por bactérias aeróbicas e gram-positivas que formam endósporos, resistentes a condições ambientais adversas tais como calor e dessecação, sendo tipicamente representados por células aeróbicas móveis por flagelos, mas podem também crescer em ambientes anaeróbicos (MADIGAN et al., 2010). A maioria é mesófila, com temperatura ótima entre 30 e 45°C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem a temperaturas de 65°C ou mais altas. Além disso, também são capazes de crescer sob condições extremas de pH e, por isso, originam produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (MADIGAN et al., 2010).



São classificadas em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio (CRICKMORE, 2017): Grupo I formado por bacilos Gram-positivos que apresentam esporo central ou terminal, esféricos ou ovoides; Grupo II representado por espécies Gram-variáveis, que possuem esporo oval, central ou terminal capazes de deformar a parede celular; e o Grupo III caracterizado por bacilos Gram-variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal que deformam a parede celular, dentre os quais o *Bacillus thuringiensis*, sintetiza um cristal composto de toxinas letais para insetos.

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico de insetos/pragas, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bti) Berliner, 1915 (*Bacillales: Bacillaceae*) é considerada a espécie de maior interesse para a produção de proteínas com atividade inseticida (DE MAAGD et al., 2003). A sua utilização aumentou significativamente ao longo das últimas décadas, pois é uma bactéria facilmente produzida em larga escala, o que favorece a sua aplicação em campo (KUMAR et al., 2008; ÂNGELO et al., 2010; BRAVO et al., 2011). Este microrganismo é o principal patógeno utilizado no controle de insetos/pragas sendo das ordens *Díptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hemiptera* (BRAVO et al., 2011).

### 3.3 CONTROLE BIOLÓGICO COM BTI

A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi descoberta no Japão, em 1902, por Ishiwata, o qual a relacionou como responsável pela mortalidade do bicho-da-seda. Porém, somente em 1920, na Europa, é que os primeiros ensaios para o controle biológico foram implementados (HABIB e ANDRADE, 1998). A ação inseticida de Bti são conferidas pela presença de cristal de proteínas produzido durante a fase de esporulação, que atuam como toxinas inseticidas (ALVES, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Na natureza esta espécie pode ser isolada a partir de diversos substratos, tais como: solo, insetos mortos, plantas, entre outros, a partir do qual é possível encontrar linhagens com diferentes perfis genéticos e com toxicidade distinta (COSTA et al., 2010; ELLEUCH et al., 2015). Os diferentes isolados obtidos têm mostrado elevada toxicidade para diversos grupos de insetos, o que evidencia o seu potencial como agente de controle biológico para o controle de insetos em todo o mundo (HÖFTE; WHITELEY, 1989; POLANCZYK; ALVES, 2003; GALZER; FILHO, 2016; LIU et al.,

2016; BRAVO et al., 1998; RAYMOND et al., 2010; SALAMA et al., 2015; SOARES-DA-SILVA et al., 2015; EL-KERSH et al., 2016; REYAZ et al., 2017).

A elaboração do para-esporo não é única no gênero *Bacillus*, pois o *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus* e certas linhagens do *Paenibacillus lentimorbus* são capazes de produzir tais cristais (BRAVO et al., 2007). Este microrganismo apresenta como diferencial em relação a outros agentes entomopatógenos a presença de elevada variabilidade genética, pois os genes capazes de sintetizar proteínas com ação inseticida localizam-se geralmente em grandes plasmídeos, frequentemente conjugativos, o que pode possibilita a formação de linhagens com diversos perfis de toxicidade, o que representa vantagem frente a outros patógenos (BRAVO et al., 2011). Em relação ao seu modo de ação, pesquisadores em todo o mundo tentam pormenorizar o mecanismo de ação através do qual as proteínas Bti matam os insetos.

### 3.3.1 Caracterização Microbiológica

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica facultativa; que apresenta forma de bastonete medindo de 1 a 1,2 µm de diâmetro por 3 a 5 µm de comprimento, facilmente encontrada em qualquer ambiente na faixa de temperatura variando de 10 a 45 °C, e forma esporos elípticos e cilíndricos (MARTIN; TRAVERS, 1989; HABIB; ANDRADE, 1998; BOBROWSKI et al., 2003; SOARES-DA-SILVA et al., 2015; BOUKEDI et al., 2016; EL-KERSH et al., 2016; REYAZ et al., 2017; SAUKA; BENINTENDE, 2017). O seu ciclo de vida se divide em duas fases principais: a primeira, de crescimento vegetativo, onde a bactéria se multiplica por bipartição e a outra fase, a de esporulação, que consiste na formação de esporos (MARTINS et al., 2008).

No que diz respeito à diferenciação de bactéria e esporo, a importância está relacionada ao esporo da bactéria apresentar patogenicidade, uma vez que, a parede celular deste contém proteínas semelhantes às proteínas dos cristais, com características químicas e patogênicas (HABIB; ANDRADE, 1998). Assim, a maioria dos produtos comercializados associa esporos e cristais com a intenção de aumentar sua atividade tóxica (POLANCZYK et al., 2004). No início da fase de esporulação são sintetizadas grandes quantidades de proteínas que possuem atividade inseticida.

### 3.3.2 Proteínas Inseticidas

No processo de esporulação do Bti, na qual produz proteínas conhecidas como cristais parasporais, que são compostos por  $\delta$ -endotoxinas que são tóxicas para insetos e são inofensivas aos humanos, plantas e outros animais (FRANKENHUYZEN, 2013). As  $\delta$ -endotoxinas são divididas em duas famílias multigênicas chamadas Cry e Cyt (DE MAAGD *et al.*, 2003). O grupo de proteínas Cry é altamente tóxico a insetos das ordens *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* e *Diptera* (BRAVO; SOBERÓN, 2008).

As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pela qual elas são denominadas Cry (YAMAMOTO; DEAN, 2000). Esta inclusão proteica é o fator que caracteriza a espécie de *Bacillus thuringiensis* e confere a muitas linhagens o potencial entomopatogênico. Além das proteínas Cry, a bactéria Bti sintetiza, durante a sua fase de crescimento vegetativo, as proteínas Vip (*Vegetative Insecticidal Proteins*), que têm demonstrado especificidade a insetos da ordem *Lepidoptera* (ESTRUCH *et al.*, 1996), além das proteínas Cyt, que possuem atividade citolítica *in vitro* e especificidade *in vivo* aos dípteros (DE MAAGD *et al.*, 2003), podendo seu modo de ação também estar relacionado a um sinergismo com outras toxinas produzidas pelos isolados.

O isolamento e seleção de Bti, em diferentes tipos de ambientes tem possibilitado a descoberta de diversas combinações de genes Cry e Cyt (COSTA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012; EL-KERSH *et al.*, 2016). As toxinas Cry e Cyt são sintetizadas sob condições restritas de crescimento, sendo que as proteínas Cry possuem massa molecular entre 40 e 140 kDa e são codificadas por diferentes genes denominados genes Cry, e as toxinas Cyt são proteínas menores, com massa em torno de 25 kDa e codificadas por gene Cyt (AGAISSE; LERECLUS, 1995; SARASWATHY; KUMAR, 2004).

O entomopatógeno também produz outros fatores de virulência, como as  $\beta$ -exotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HÖFTE; WHITELEY, 1989; DE MAAGD *et al.*, 2003). Esses autores declaram desconhecida a exata contribuição de cada fator na virulência da bactéria, sendo uma dificuldade determinar o espectro tóxico de um isolado que sintetiza mais de uma proteína. Isso porque, quando os fragmentos tóxicos vão se ligar aos receptores da

membrana do intestino médio do inseto, ocorre uma competição pelos sítios de ligação, que pode interferir na toxicidade do isolado.

Atualmente, são conhecidas cerca de 400 toxinas Cry de Bti, com ação para vários grupos de insetos: *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Isoptera*, *Orthoptera*, *Siphonaptera*, *Thisanoptera*, *Mallophaga*, *Hemiptera* e *Diptera* (FRANKENHUYZEN, 2013; CRICKMORE, 2017). Em contraste, para a família das toxinas Cyt, são conhecidas atualmente 11 proteínas inseticidas (CRICKMORE, 2017). Diferente do amplo espectro das Cry, as toxinas Cyt mostram especificidade, para dípteros, e têm sido relatadas somente em linhagens com ação específica para esses insetos, mostrando-se importante componente para o controle de mosquitos (BEN-DOV, 2014). Atualmente seis toxinas Cyt possuem ação comprovada para larvas de mosquitos: Cyt1Aa, Cyt1Ab, Cyt1Ba, Cyt2Aa, Cyt2Ba e Cy2Bc (CRICKMORE, 2017).

Glare e O'callaghan (2000) em sua revisão sobre as espécies pragas susceptíveis ao Bti, elencaram mais de 266 espécies da ordem díptera, 106 espécies da ordem coleóptera e 572 espécies da ordem lepidóptera. Guttmann e Ellar (2000) identificaram isolados de *Bacillus thuringiensis* com a presença de hemolisinas, quitinases, lecitinases e presença do gene que codifica a enterotoxina, uma toxina produzida por diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*, com peso molecular em torno de 45 kDa, e que pode ser tóxica a vertebrados, uma vez que é análoga à toxina produzida por *Bacillus cereus* (BERGAMASCO *et al.*, 2013).

As proteínas Cry1 apresentam peso molecular entre 130 e 140 kDa e são armazenadas em cristais bipiramidais, estes genes são os mais frequentes na natureza, representando mais de 43% dos genes Cry caracterizados (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Entre as proteínas Cry, a proteína Cry1Ia10 merece destaque uma vez que esta foi isolada e teve sua sequenciada (ESPINDOLA, 2003). Desta forma, as proteínas Cry1I têm se tornado excelentes candidatas para o controle de pragas de interesse econômico, e uma alternativa ao manejo da resistência das pragas às proteínas Cry1A, que têm sido extensivamente utilizadas como inseticida biológico e em plantas transgênicas, uma vez que estudos apontam que a proteínas Cry1I não compartilham os mesmos receptores das proteínas Cry1A, no intestino médio dos insetos-praga (ESCUADERO *et al.*, 2006).

Em estudos desenvolvidos por Bergamasco *et al.* (2011), a toxicidade desta proteína foi avaliada e demonstrou ser dotada de especificidade tanto para insetos da

ordem *Lepidoptera* quanto *Coleoptera* o que a coloca como uma promissora proteína para o controle de pragas. Estas proteínas possuem uma ampla gama de hospedeiro, incluindo espécies importantes de lepidópteros e coleópteros (TAILOR *et al.*, 1992). Por não se acumularem em cristais estas proteínas não são incluídas como ingrediente ativo em inseticidas a base de Bti, embora sua eficácia na proteção de plantas contra o ataque de pragas já tenha sido demonstrada (LAGNAOUI *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2004).

As proteínas Vip pertencem a uma classe de proteínas produzidas por algumas linhagens de *Bacillus thuringiensis*, durante o estágio vegetativo de seu crescimento, sendo secretada no meio de cultura como proteína solúvel (ESTRUCH *et al.*, 1996). As proteínas Vip não têm homologia de sequência ou estrutura com as proteínas Cry (RANG *et al.*, 2005), e são classificadas em quatro classes diferentes (CRICKMORE *et al.*, 2014). As classes Vip1 e Vip2 formam uma proteína binária com atividade inseticida contra larvas de coleópteros (WARREN, 1997; LEUBER *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). Entre as proteínas Vip3A, as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 foram as primeiras a serem isoladas e sequenciadas (MARUCCI, 2010).

De acordo com Estruch *et al.* (1996) o gene Vip3A codificador da proteína Vip3A inicia sua expressão durante a fase de crescimento vegetativo e continua ativamente expresso em culturas esporulantes. Altos níveis de expressão em combinação com alta estabilidade da proteína favorecem a produção de grandes somas de proteína nos sobrenadantes de culturas esporulantes.

### 3.3.3 Mecanismos De Ação

O mecanismo de ação deste agente biológico baseia-se na solubilização das proteínas inseticidas no meio alcalino do intestino dos insetos. Essas proteínas são conhecidas como  $\delta$ -endotoxinas, que são compostas de duas famílias multigênicas, as proteínas Cry (Crystal) e Cyt (Citolíticas), as quais são tóxicas a insetos de diferentes ordens (HÖFTE; WHITELEY, 1989; ALVES, 1998; BRAVO; SOBERÓN, 2008; FRANKENHUYZEN, 2013; BADRAN *et al.*, 2016). Estas toxinas apresentam formas distintas de ação (CRICKMORE, 1995; OTIENO-AYAYO *et al.*, 2008; CANTÓN *et al.*, 2011; CÔRREA, 2012).

Entre as proteínas produzidas por Bti, destacam-se as Cry, Cyt e Vip, que apresentam especificidade a insetos pragas de diversas ordens (SENA et al., 2009; GUO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; CRIALESI-LEGORI et al., 2014). A atividade inseticida deve-se às proteinases tóxicas produzidas na forma de cristais durante o segundo estágio da esporulação. Após sua ingestão, estes cristais são dissolvidos em meio alcalino do intestino médio dos insetos, onde as protoxinas que requerem ativação proteolítica são liberadas. As proteases do intestino desdobram as protoxinas e produzem uma proteína ativada de menor tamanho capaz de passar pela membrana peritrófica e se ligar a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio dos insetos. Após a ligação com o receptor, a toxina cria poros que interferem no sistema de transporte de íons pelo tecido da membrana do inseto, causando a lise do epitélio de seu intestino médio, baixando o pH do lúmen e favorecendo a germinação dos esporos que acarretarão na septicemia e morte do inseto contaminado (GLARE; O' CALLAGHAM, 2000).

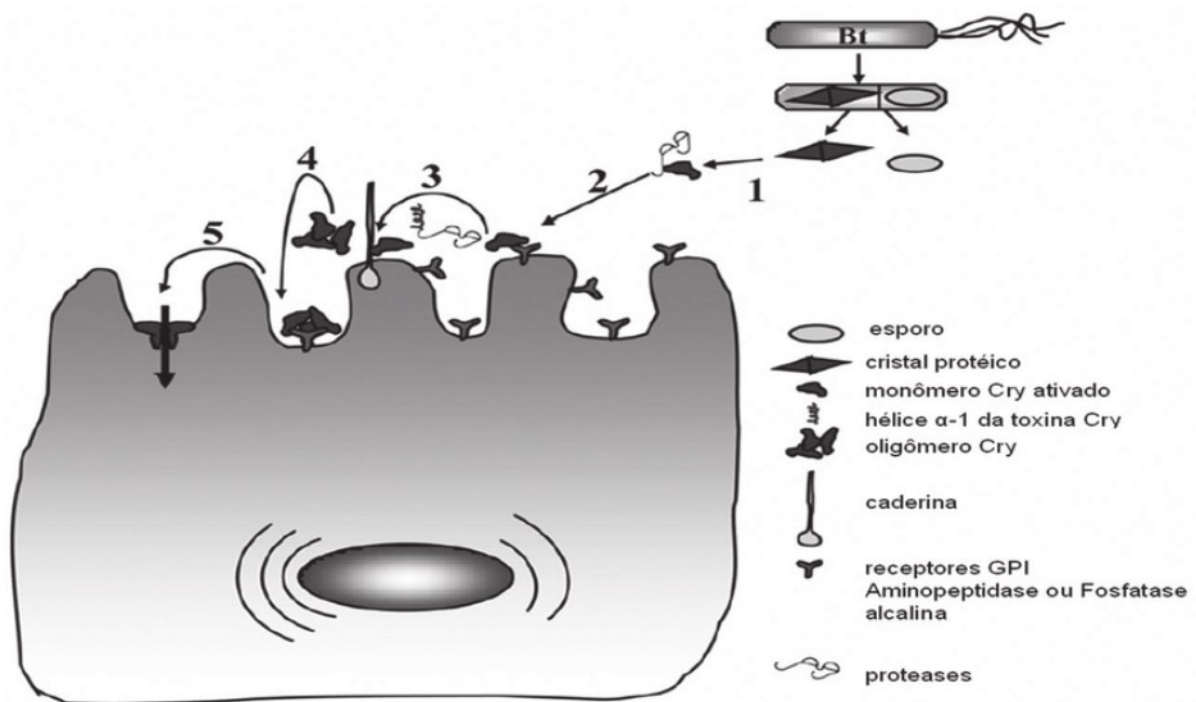
As toxinas Cry precisam se ligar a receptores específicos no epitélio intestinal das larvas, por outro lado as toxinas Cyt apresentam ação hemolítica e citolítica; atuam interagindo diretamente com a membrana lipídica das células do intestino médio dos insetos. Dois mecanismos são propostos para explicar o mecanismo de ação das Cyt: essas toxinas ou atuam formando poros na membrana ou destruindo-a através de ação detergente, o que propicia a inserção toxinas Cry no epitélio intestinal dos mosquitos e, conseqüentemente a sua morte (FERNÁNDEZ-LUNA et al., 2010; CANTÓN et al., 2011).

As proteínas do cristal tornam-se tóxicas para os insetos quando são ingeridas pelas larvas. Após a ingestão, os cristais são solubilizados no pH alcalino intestinal, devido a presença de enzimas digestivas, e são convertidos em polipeptídios tóxicos. Estas toxinas ligam-se aos receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, o que interfere no gradiente iônico e no balanço osmótico das células, formando poros, causando lise, conseqüentemente ruptura e desintegração, o que culmina com a morte do inseto – Figura 2 (HÖFTE; WHITELEY, 1989; BRAVO et al., 2011; COPPING; MENN, 2000; ZHANG et al., 2016).

A ausência de similaridade nas sequências de aminoácidos nas diferentes classes de proteínas permite que diferentes toxinas possam ser combinadas para se ligarem a distintos receptores na membrana epitelial do intestino médio dos insetos-

praga, visando evitar a evolução da resistência destes insetos (SENA et al., 2009; GOUFFON et al., 2011). As toxinas Cry e Cyt, quando presentes na mesma linhagem, atuam em sinergismo. A presença de Cyt1Aa em combinação com as toxinas Cry 4Aa, Cry 4Ba, Cry 10Aa, Cry 11Aa e Cry 11Ba, em *Bacillus thuringiensis israelensis*, torna essa cepa a mais eficiente no controle de vetores.

**Figura 2-** Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis* na membrana do epitélio intestinal de larvas de insetos.



Fonte: Bravo et al., 2011.

Um estudo sobre patologia e alterações histológicas causadas por *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis* em cinco coleópteros, Mendeleck (1993) constatou a efetividade de *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis* para os coleópteros das famílias Cucujidae, Tenebrionidae e Nitidulidae. A explicação para diversas famílias está relacionada à solubilização dos cristais no intestino de cada inseto, podendo variar a eficácia na mortalidade entre famílias e ordens de cada inseto. Ainda, de acordo com o autor, para larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) verificou-se mortalidade de 30% 136 horas após a aplicação.

Soares da Silva et al. (2015) analisaram 97 estirpes de *Bacillus thuringiensis* contra o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) e verificaram que 26 estirpes causaram mortalidade superior a 50% nos insetos. Em trabalho semelhante, Martins (2009) ao avaliar 215 estirpes de *B. thuringiensis* sobre *A. grandis* verificou cinco estirpes (S325, S601, S785, S811 e S1806) que ocasionaram mortalidade acima de 75% em larvas. Sallet (2013) avaliou 193 estirpes da bactéria *B. thuringiensis*, a fim de conhecer a toxicidade destas sobre uma praga de aviários (cascudinho). Entre as estirpes avaliadas, apenas 10 apresentaram toxicidade ao inseto adulto, sendo que somente a estirpe S1806 nativa e a S2492 recombinante, provocaram mortalidade em níveis de 60 % e 80 %, respectivamente.

### 3.3.4 Produção De BTI Em Escala Industrial

A demanda por produtos de origem microbiana é crescente devido à sua aplicação em uma enorme variedade de processos, ampla diversidade bioquímica, suscetibilidade à manipulação genética, menor tempo e custo de produção (Lima et al., 2001). Diversas fontes naturais complexas, como resíduos agrícolas e agroindustriais, têm sido utilizadas com o objetivo de obter grandes quantidades de biomassa microbiana, mesmo quando suas moléculas apresentam níveis de atividade menores (LEE et al., 2010). Estes resíduos, após serem devidamente moídos ou triturados servem como fontes de nutrientes, principalmente de carbono, em fermentações (DA SILVA et al., 1994).

Neste sentido, bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo em misturas complexas típicas de resíduos. Conseqüentemente, são notáveis produtoras de uma ampla gama de enzimas hidrolíticas extracelulares de grande interesse comercial. Por isso, o isolamento de espécies deste gênero para a produção de enzimas com novas propriedades é um tema de grande relevância para a comunidade científica. Adicionalmente, Schallmeyer et al. (2004) enfatizam a habilidade de produzir e secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares, presença de espécies termófilas capazes de fermentar em uma ampla variedade de valores de pH, faz com que as cepas do gênero *Bacillus* sejam dominantes nos processos de fermentação microbiológica, gerando produtos enzimáticos comerciais com aplicabilidades específicas.



Kraemer-Schafhalter e Moser (1996), estudando a cinética de produção de Bti em batelada, em escala laboratorial, determinaram alguns parâmetros importantes quanto à aeração e principais nutrientes requeridos por aquele microrganismo. A proteína é a principal fonte de energia e necessidades metabólicas; entretanto, uma fonte de carbono é essencial. A glicose é necessária no meio para o crescimento celular e pode ser metabolizada a partir do amido. O único produto formado em grandes quantidades no primeiro estágio da fermentação é o acetato, que é um importante produto intermediário do metabolismo da glicose, pois está relacionado com a formação de esporos e é consumido à medida que o microrganismo inicia a esporulação. Diversos estudos já foram realizados buscando uma formulação economicamente viável para a produção de esporos de Bti

### 3.4 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os maiores índices de produtividade de resíduos do setor agrícola são das culturas do trigo, soja e milho respectivamente. Como as culturas da soja e do milho apresentam volumes de produção superiores às outras culturas, o maior potencial de disponibilidade de resíduos, conseqüentemente, a disponibilidade dos resíduos agropecuários é estimada com base na produção agrícola, no material orgânico resultante após a extração de madeiras e na atividade pecuarista dos municípios (CENBIO, 2016).

Podemos estabelecer uma relação entre o tipo de produção agrícola e a quantidade de resíduos gerados durante as etapas de obtenção do produto. As biomassas mais relevantes em termos de energia são aquelas oriundas de culturas energéticas e de processos agrícolas, sendo que os resíduos gerados possuem origem vegetal e são subprodutos de outros processos (NONHEBEL, 2007). Assim, a análise de reaproveitamento energético destes resíduos se apresenta como questão relevante e altamente atrativa no cenário brasileiro em termos ambientais e socioeconômicos.

De acordo com a Norma Brasileira ABNT NBR 10004:2004, os resíduos agroindustriais se enquadram na categoria “resíduos nos estados sólido e semissólido”, incluindo-se além dos materiais orgânicos as águas residuais, cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento direto na rede pública de esgotos ou corpos de água, exigindo soluções técnicas e economicamente viáveis para se

realizar a melhor destinação possível do resíduo conforme suas características e o nível de tecnologia disponível. Sob esta perspectiva, a devida quantificação da disponibilidade física e a determinação do conteúdo energético dos resíduos, são os primeiros passos na avaliação do seu potencial de uso.

#### 3.4.1 Milhocina

A milhocina é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e sais minerais para os micro-organismos (MENEGASSI, 2007). É um rejeito da embebição dos grãos de milho quando do fracionamento em amido e germe (óleo) contendo 40% de sólidos. A obtenção da milhocina é realizada através da maceração do milho, que apresenta um teor de proteína altíssimo, como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular (MORAES et al., 2001).

A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos. Neste contexto, Silveira et al., (2001) demonstraram que a água de maceração de milho (milhocina), que é um resíduo agroindustrial de baixo custo, pode substituir o extrato de levedura ou sulfato de amônio, com excelentes resultados.

Os produtos derivados do milho são obtidos pelo processamento seco e úmido em diferentes etapas. Na primeira etapa, o milho (após limpo e seco), é separado em endosperma e germe. Na segunda etapa, o fluxo do endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais, e na terceira etapa o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo. Nesse processo é obtido farelo peletizado, flocos de milho pré-cozidos, gritz, sêmolos, farinhas, fubás, creme e canjica (SILVEIRA et al., 2001).

A água utilizada da maceração conhecida como milhocina é destinada à estação de tratamento de efluentes que apresenta valores médios de DQO (Demanda Química de Oxigênio) de 14.000 mg/L e DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) de cerca de 11.000 mg/L (LOSS et al., 2009). Algumas indústrias utilizam a milhocina como fonte de energia na produção de celulose pela bactéria *Acetobacter xylinum* (ARAI et al., 2003). No desenvolvimento de biomassa e polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus*, a milhocina também vem sendo utilizada como fonte alternativa de nitrogênio e carbono (GERN et al., 2008). A milhocina é utilizado no segmento de

nutrição animal, na confecção de iscas atrativas para moscas de frutas e vem sendo muito usado como nutriente para processos de fermentação industrial.

A composição da milhocina é muito variável, dependendo da origem da matéria prima e de seu processamento. Uma composição química é demonstrada na Tabela 1. Dentre os compostos variados encontra-se aminoácidos, íons metálicos vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades (DOMINGOS,2009).

Tabela 1- Composição típica da água de maceração (milhocina).

<b>Substância (base seca)</b>	<b>Concentração (%)</b>
Materia seca	50,7
pH	3,9
Proteína	40,8
Ácido láctico	16,0
Açúcares redutores	12,8
Compostos variados	30,4

**Fonte:** AKHTAR (1998).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMO

Todos os experimentos foram realizados com a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (sorotipo NRRL HD-11), adquirida junto ao USDA e mantida em ultrafreezer - 80 °C.

### 4.2 FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO DE BTI

Os nutrientes avaliados assim como seus níveis iniciais foram escolhidos de acordo com revisões bibliográficas na elaboração do meio de cultura, ou seja, dados da literatura na qual as fontes testadas foram:

- Glicose – foi utilizado apenas uma fonte de carbono afim de avaliar a relação carbono: nitrogênio na fermentação em estudo, a seleção da glicose foi devido ser comumente empregada no cultivo de Bti (ARCAS,1987).
- Como fonte de nitrogênio inorgânico foi utilizado o sulfato de amônio o qual compõe o meio arcas, comumente utilizado na fermentação de Bti (ARCAS,1987).
- Entre as diversas fontes de nitrogênio orgânicas disponíveis para compor o meio de cultura como uma fonte alternativa para enriquecimento, a milhocina ou água de maceração do milho foi selecionada principalmente por sua elevada disponibilidade, elevado teor de nutrientes e baixo custo quando comparado com o uso de insumos químicos comerciais.
- Entre as fontes de nitrogênio orgânica o extrato de levedura é bastante utilizado no cultivo do Bti, devido seus valores nutrientes essenciais para fermentação (VORA; SHETNA,1999).

Os componentes na forma de sais e micronutrientes seguem os montantes descritos na Tabela 2, uma vez que a literatura específica indica que estes nutrientes apresentam pouca influência no desenvolvimento de Bti (VORA; SHETNA,1999).

**Tabela 2-** Componentes dos micronutrientes inalterados nos delineamentos experimentais.

Micronutrientes (g)	50 mL	100 L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,11	9,9
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03	2,7
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,50	45
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,50	135
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,20	18
NaCl	0,02	1,8
<b>Total</b>	<b>2,36</b>	<b>212,40</b>

**Fonte:** o autor.

Para identificar a melhor composição do meio de cultura para cada uma das fontes de nitrogênio e carbono analisadas, foram aplicadas concentrações variáveis dos quatro componentes do meio de cultura (Tabela 3), sendo eles: extrato de levedura (0, 12,5 e 25 g/L), sulfato de amônio (0, 5 e 10 g/L), glicose (0, 5 e 10 g/L), e o resíduo agroindustrial milhocina (0, 22,5 e 45 g/L).

**Tabela 3-** Níveis utilizados com suas respectivas concentrações

Nível	-1	+1
Glicose (g/L)	0,00	10,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	0,00	10,0
Extrato levedura (g/L)	0,00	25,0
Milhocina (g/L)	0,00	45,0

**Fonte:** o autor.

A seleção e concentrações dos nutrientes foram realizadas através de estudos bibliográficos realizados, e por meio de um Delineamento Composto Central (DCC) 24, no qual cada variável foi estudada em dois níveis (-1 e +1) com variações extremas onde são possíveis de se obter 16 diferentes combinações fatoriais e pontos centrais em triplicata, em conjunto com um tratamento com meio TGY puro utilizado como amostra controle. Objetivo desta etapa foi criar um contraste entre os níveis e, com

isto, realizar uma seleção qualitativa. A Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central (DCC)  $2^4$  está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4- Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central (DCC)  $2^4$ , com valores codificados e reais para o estudo dos efeitos de glicose, sulfato de amônia, extrato de levedura e milhocina no crescimento de Bti.

Ensaio	Valores codificados				Valores reais			
	Glicose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Extrato levedura	Milhocina	Glicose (g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	Extrato levedura (g/L)	Milhocina (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	0,0	0,0	0,0	0,0
2	+1	-1	-1	-1	10,0	0,0	0,0	0,0
3	-1	+1	-1	-1	0,0	10,0	0,0	0,0
4	+1	+1	-1	-1	10,0	10,0	0,0	0,0
5	-1	-1	+1	-1	0,0	0,0	25,0	0,0
6	+1	-1	+1	-1	10,0	0,0	25,0	0,0
7	-1	+1	+1	-1	0,0	10,0	25,0	0,0
8	+1	+1	+1	-1	10,0	10,0	25,0	0,0
9	-1	-1	-1	+1	0,0	0,0	0,0	45,0
10	+1	-1	-1	+1	10,0	0,0	0,0	45,0
11	-1	+1	-1	+1	0,0	10,0	0,0	45,0
12	+1	+1	-1	+1	10,0	10,0	0,0	45,0
13	-1	-1	+1	+1	0,0	0,0	25,0	45,0
14	+1	-1	+1	+1	10,0	0,0	25,0	45,0
15	-1	+1	+1	+1	0,0	10,0	25,0	45,0
16	+1	+1	+1	+1	10,0	10,0	25,0	45,0
17	0	0	0	0	5	5	12,5	22,5
18	0	0	0	0	5	5	12,5	22,5
19	0	0	0	0	5	5	12,5	22,5

**Fonte:** o autor.

Os resultados obtidos foram utilizados para o modelo capaz de prever a concentração celular de Bti em função dos valores experimentais, com o uso de diferentes concentrações de glicose, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, extrato de levedura e milhocina, adotando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), afim de definir o meio de cultura

nos ensaios em Erlenmeyer, e fazer escalonamento para o biorreator piloto com meio de cultura otimizado.

### 4.3 RECUPERAÇÃO E MANUTENÇÃO DO BANCO DE CEPAS

A manutenção das culturas bacterianas em banco de cepas foi realizada pela adição do líofilo adicionado em Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultura (TGY). Os frascos foram mantidos a 30 °C, 170 rpm em uma estufa incubadora rotatória (TECNAL, TE 421) por 24h, após a ativação e crescimento microbiano, foram realizadas microscopia, e avaliado a pureza, o tempo foi suficiente para garantir uma taxa de esporulação superior a 80%. Uma vez checada a pureza da linhagem, foram adicionados 30 % de crioprotetor (glicerol) sobre o volume do caldo fermentado e transferidos para microtubos de 2 mL e acondicionados em ultrafreezer (Frio-Cold).

### 4.4 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (sorotipo NRRL HD-11), foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL com chicanas contendo 50 mL de meio TGY, cobertos com manta de algodão e gaze. Os frascos com TGY foram autoclavados a 121°C por 20 min e realizado ambientação de temperatura. Posteriormente foram inoculados por transferência direta de 0,5 mL do microtubo de 2 mL anteriormente acondicionados em ultrafreezer.

Posteriormente os frascos foram incubados em incubadora/agitadora de movimento recíproco (TECNAL TE 421- Figura 7) a 30 °C por 16 h sob agitação (170 min). No término da fermentação do inóculo foram avaliados a pureza dos mesmos afim de utilizar uma alíquota desta cultura, para inocular os experimentos fermentativos. Os meios fermentativos foram acondicionados sob refrigeração a 4 °C até o momento da inoculação. (ANDRADE,2005).

#### 4.4.1 Ensaios Em Erlenmeyer

Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyer* de 250 mL com chicanas, contendo 50 mL de meio de cultura conforme o planejamento experimental, cobertos

com manta de algodão e gaze. Estes foram inicialmente inoculados com uma taxa (1% v/v) e posteriormente incubados em incubadora/agitadora de movimento recíproco a 30 °C sob agitação por 170 min.

Em todos ensaios o final da fermentação correspondeu ao tempo de 16 horas, na qual durante o cultivo foram amostrados periodicamente e realizado análise de microscopia e concentração celular. O alvo deste grupo de ensaios foi avaliar o desempenho do *Bacillus thuringiensis* em meios de cultura com diferentes formulações em função do planejamento experimental, e comparado com meio TGY utilizado como amostra controle.

#### 4.4.2 Ensaio Em Biorreator

O ensaio realizado em biorreator (TECNAL modelo BIO-TEC-150-I-E) (Figura 3- ). Equipado com controle automático de temperatura, pH, agitação, aeração, oxigênio dissolvido e nível de espuma. A cuba deste fermentador apresenta 150 L de volume útil, porem são utilizados 100L como volume de trabalho contendo o meio de fermentação. As utilidades básicas do fermentador são através de vapor industrial para esterilização e ar comprimido para aeração.

**Figura 3-** Biorreator de 150 L para realização de experimentos em escala piloto.



Fonte: o autor.



Foram utilizados os acessórios na tampa e no costado do biorreator como condensador, luminárias, manômetros, sensor de nível de espuma, septo, válvulas, disco de ruptura, no caso das sondas de oxigênio dissolvido e pH foram realizadas as calibrações anteriormente e instaladas no fermentador conforme o diagrama de instrumentação do equipamento. Após essa etapa foi realizado as esterilizações do fermentador, primeiro foi esterilizado o biorreator vazio via vapor direto pelo aspensor, incluindo todas as linhas de adição de nutrientes e reagentes, filtros de entrada de ar e filtros de exaustão, com de vapor a 121 °C durante 20 min.

Posteriormente realizou-se a operação de esterilização com o fermentador cheio, a qual consiste em adicionar os 100 L de meio de cultura em conjunto com vapor direto via jaqueta do fermentador até atingir a temperatura de 121 °C, a partir da qual contam-se 40 min. Após a ambientação da temperatura a 30 °C são ligado o agitador a 200 RPM, o pH inicial foi corrigido automaticamente para 7,00 com adição de solução NaOH 5 M. Após a estabilização de temperatura, foi aplicado taxa de inóculo 1% (v/v) no biorreator.

As condições iniciais de operação no biorreator foram as seguintes: temperatura a 30°C; agitação 200 RPM; pH, entre 6,7 e 7,3 controlado pela adição de solução de NaOH 5M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2M; concentração de oxigênio dissolvido mantida no nível mínimo de 20 % de saturação, com ajustes na velocidade de agitação e aeração.

O nível de espuma foi controlado automaticamente fazendo uso de antiespumante comercial MERCK. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada com o emprego de um eletrodo polarográfico esterilizável (HAMINTON - EASY FERM).

#### 4.5 MONITORAMENTO DOS PARAMETROS FERMENTATIVOS

Os parâmetros para avaliação dos resultados foram as concentrações celulares finais e principalmente taxa de esporulação, além da cinética de crescimento. Os Erlenmeyers eram retirados da incubadora pelo menor tempo possível e as amostras retiradas com auxílio de um pipetador automático em cabine de fluxo laminar (VECO modelo Classe II – tipo A/B3).

Nos ensaios em frascos agitados, amostras de meio foram coletadas esporadicamente até o término da esporulação e declínio da fermentação, para a

determinação da concentração celular e microscopia. Ao final do processo, outra alíquota foi retirada para a contagem do número de células totais e de esporos.

Nos ensaios em biorreator piloto o sistema utilizado para retirada de amostras é feito através de válvulas semiautomáticas, e posteriormente esterilizadas em vapor durante 15 minutos para garantir a assepsia da amostra. Foram analisadas a concentração celular e além microscopia celular ao longo de todo o processo e mensurando o número de células vegetativas e esporos no término da fermentação.

#### 4.5.1 Produtividade Em Células

O termo ( $Q_x$ ) utilizado para calcular a produtividade volumétrica, onde é representado pela quantidade de células produzidas por horas de cultivo fermentativo, na qual calcula-se as concentrações iniciais e finais de células ( $X_i$  e  $X_f$ ) e os tempos iniciais e finais da fermentação ( $T_i$  e  $T_f$ ) conforme a Equação 1.

$$Q_x \left( \frac{g}{L} \cdot h \right) = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (1)$$

Onde:  $X_f$  - concentração celular máxima;  $X_i$  - concentração celular inicial;  $t_f - t_i$  - tempo necessário para obter a máxima concentração celular.

#### 4.5.2 Velocidade Específica De Crescimento

Para os cálculos das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ), e consumo de substrato ( $\mu_s$ ), as curvas sigmoidais foram ajustadas aos dados experimentais de concentrações celulares, nutrientes utilizados com o tempo foram ajustados, na qual utilizou-se o modelo de Boltzmann (Equação 2).

$$y = a + \frac{b-a}{a + \exp\left(\frac{c-x}{d}\right)} = \quad (1)$$

Onde: a,b, c, d - parâmetros do modelo; y - valor da concentração celular estimada a partir do modelo; X - tempo de fermentação.

Com os valores de concentração celular coletados de tempo em tempo, construiu-se uma curva ajustada relacionando o logaritmo neperiano de X ( $\ln X$ ) com o tempo. Este tipo de gráfico apresenta logo após a fase lag um trecho linear, com inclinação máxima, que corresponde à fase exponencial de crescimento. O coeficiente angular deste trecho linear corresponde ao valor de  $\mu_m$ .

## 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.6.1 Coleta De Amostras

As amostragens em Erlenmeyer foram coletadas periodicamente para a determinação da concentração celular, taxa de formação de esporos e avaliar qualitativamente o caldo fermentado. No ensaio do fermentador piloto foi repetido a mesma avaliação e periodicidade de amostragem, sendo que para amostragem no fermentador piloto são necessários esterilização da linha e válvula de amostragem via vapor por 15 minutos a 121° C. Posteriormente resfriado o sistema foi realizado a amostragem, para cada amostragem repete-se o procedimento. Adicionalmente, parâmetros como pH, oxigênio dissolvido em relação à saturação ( $pO_2$ ), temperatura entre outros foram obtidos através da estação de trabalho do fermentador.

### 4.6.2 Lâminas Para Análise Microscópica

A fim de acompanhar a morfologia das células durante o estudo da cinética, bem como avaliar de modo qualitativo possíveis contaminações nos experimentos, foram preparadas lâminas para análise em microscópio (NIKON modelo E200).

Para confecção das lâminas, amostras das culturas foram retiradas com auxílio do micropipetador em fluxo laminar na qual é ambiente estéril periodicamente.

As preparações a fresco são especialmente úteis para a observação de aspectos relativos à morfologia do microrganismo e ao processo de esporulação, características inerentes à espécie Bti. As células esporuladas e os esporos de Bti são perfeitamente visíveis nas condições utilizadas com aumento de (100x) no microscópio, o que tornou possível a sua avaliação de pureza.

#### 4.6.3 Concentração Celular

A concentração celular nas primeiras horas do cultivo foi quantificada indiretamente pela medida da absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado, convertida em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por uma equação que descrevia o trecho linear de uma curva de calibração. Previamente ao início do desenvolvimento do processo de produção de *Bacillus thuringiensis* foi confeccionada uma curva de calibração para correlacionar a densidade óptica, medida por Espectrofotômetro (MERCK modelo prove 600), e a concentração celular em g/L.

A partir do início da floculação da cultura, a medida da concentração celular foi feita diretamente por gravimetria, seguindo o mesmo procedimento usado nos quatro primeiros passos descritos. Para a construção da curva foi utilizada uma suspensão de células de Bti produzida em meio TGY, nas mesmas condições adotadas para os ensaios de fermentação.

Para tanto, 30 mL do meio fermentado foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 min a 10 °C (Centrífuga Eppendorf modelo 5804R), descartando-se o sobrenadante. A biomassa foi homogeneizada em água destilada e centrifugado nas mesmas condições, sendo esta operação repetida duas vezes.

As células foram transferidas para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados, os quais foram colocados em estufa a 85 °C por 24h. Após resfriamento por 20 min em dessecador, os cadinhos foram pesados e a concentração celular foi calculada dividindo-se a massa seca de células pelo volume inicial de meio fermentado.

Paralelamente às operações de determinação da massa seca de células, a absorbância das amostras, convenientemente diluídas, foi medida a 600 nm em espectrofotômetro. A absorbância de cada uma das suspensões de células foi correlacionada com a concentração celular correspondente e, com os pontos do trecho linear da reta obtida, foi definida a equação, por regressão linear, a ser utilizada no cálculo da concentração celular das amostras de fermentação durante os diferentes ensaios (BERBERT-MOLINA *et al.*, 2008).

#### 4.6.4 Contagem De Células E Esporos

O número de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (ES) ao final da fermentação foram obtidos por contagem em Câmara de Neubauer. Alíquotas de meio fermentado, convenientemente diluídas em solução salina, foram aplicadas sobre a superfície da câmara, cobertas com lamínula e observadas em microscópio de contraste de fase com aumento de 100x. A partir dos valores obtidos na contagem de 16 campos, foram calculados o número total de células (CT), o número total de esporos (ET) e a taxa de esporulação (TSP), levando-se em conta as diluições utilizadas para cada amostra. Para cada amostra, duas ou três diluições independentes foram feitas, de modo a se obter entre 15-40 células vegetativas, células esporuladas ou esporos por campo.

O número total de células (CT) foi obtido pelo somatório do número total de células vegetativas (CV), células esporuladas (CE) e esporos livres (ES) ( $CT=CV+CE+ES$ ). O número total de esporos foi calculado pela soma de CE e ES ( $ET=CE+ES$ ). A taxa de esporulação (%) foi calculada dividindo-se o número total de esporos pelo número total de células (Equação 3).

$$TSP = \left( \frac{ET}{CT} \right) \times 100 = \quad (3)$$

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se o *software* Protimiza experimental design, assim montagem dos gráficos de superfície de resposta. Os dados experimentais obtidos no planejamento experimental foram analisados com base na estatística paramétrica, ou seja, utilizando métodos derivados dos parâmetros média e variância (RODRIGUES; IEMMA,2009). Os demais gráficos foram realizados utilizando o programa Excel (versão 2016).

Posteriormente, os dados foram parametrizados, considerando a significância estatística de cada variável ao nível de confiança de 95%, onde foram elaborados modelos empíricos por meio de ajuste de modelos lineares (Equação 4) aos dados

experimentais, pelo método dos mínimos quadrados, incluindo efeitos principais e de interação.

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} x_i x_j = \quad (4)$$

Em que  $y_i$  - variável dependente;  $b_0, b_i, b_{ij}$  - coeficientes de regressão do modelo;  $x_i$  e  $x_j$  - variáveis independentes.

As análises constaram do teste da normalidade e homocedasticidade. Após a constatação da normalidade e homogeneidade dos dados, foi realizada a análise da variância, aplicando-se o teste t para testar a significância. Os dados coeficientes de regressão das variáveis independentes para cada parâmetro fermentativo ( $Q_x$ ), aos quais os valores reais das variáveis independentes foram convertidos em valores codificados para poderem ser comparados com um mesmo valor de ponderação, de acordo a Equação 5

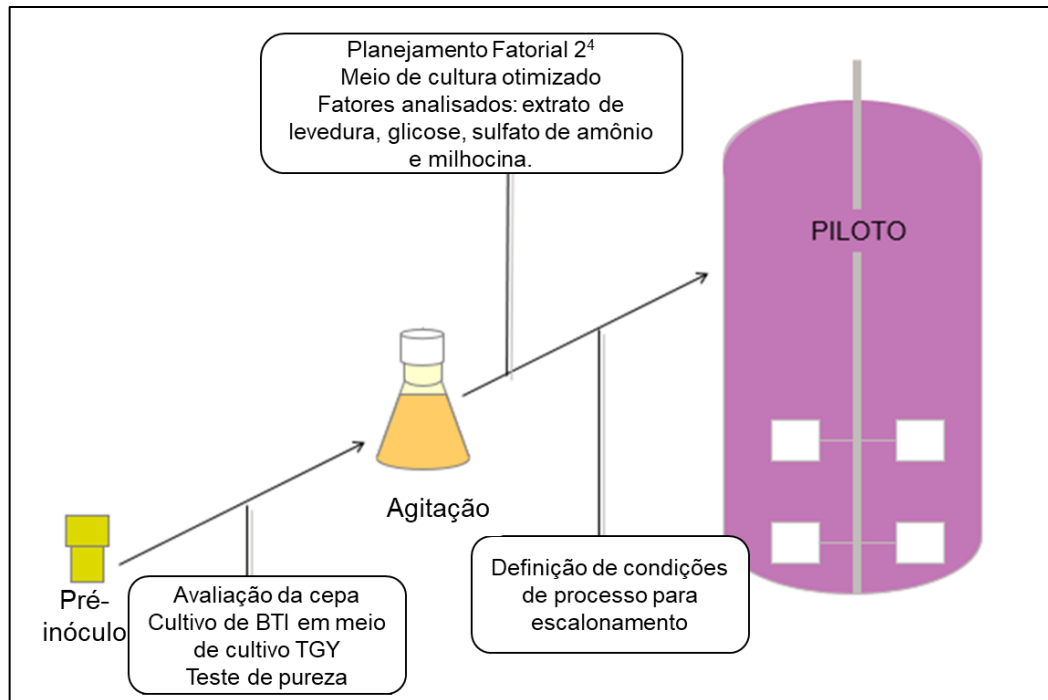
$$V_c = \frac{V_R - V_0}{\frac{\Delta V_R}{2}} = \quad (5)$$

Onde:  $V_c$  - valor codificado da variável independente;  $V_R$  - valor real da variável;  $V_0$  - valor real da variável independente no nível central;  $\Delta V_R$  - diferença entre o valor real máximo e valor real mínimo da variável independente.

## 4.8 SEQUENCIAL EXPERIMENTAL

Um esquema resumido da metodologia está representado na Figura 4.

Figura 4- Esquema representativo das etapas experimentais realizadas para desenvolvimento do meio de cultura otimizado



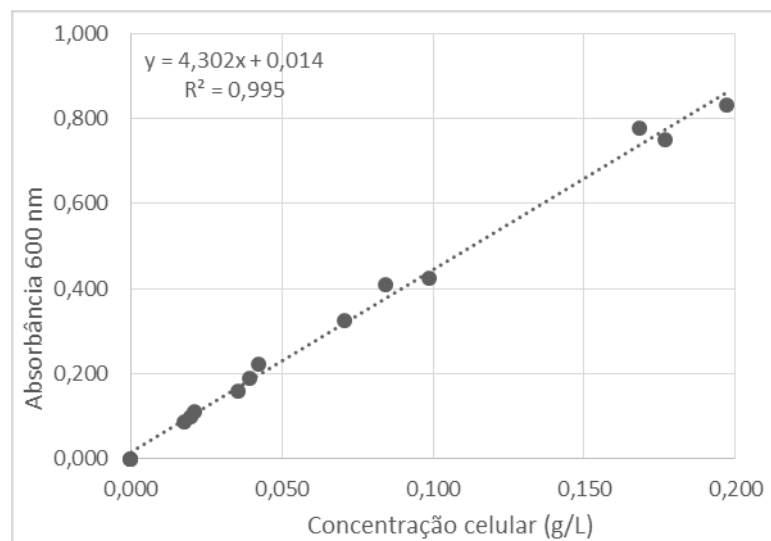
Fonte: o autor.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VALIDAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO CELULAR

Os dados da curva de concentração celular são apresentados no Gráfico 5. Os dados de absorbância a 600 nm e de concentração celular (g/L) apresentaram forte correlação, evidenciada pelo coeficiente de determinação igual a 0,995. Ou seja, a equação de primeiro grau gerada pela regressão linear explica 99,5% dos dados experimentais. Sendo assim, esta equação será utilizada para converter todos os dados de espectrofotometria (método analítico de controle em processo) em dados de concentração celular em g/L.

**Gráfico 5-** Curva de calibração da concentração celular



**Fonte:** o autor.

Posteriormente foram realizados ensaios a fim de validar a metodologia onde foi preparado uma amostra controle com massa teórica de 3,0 g/L de concentração celular, já a massa quantificada experimentalmente foi 2,98 g/L. Comparando os dados comprovou-se que a validação da metodologia foi eficaz devido seu baixo desvio de concentração celular. Sendo assim, a quantificação de concentração celular é de suma importância, para a realização das análises cinéticas do processo, pois



depende fundamentalmente da concentração de biomassa obtidas nos cultivos de *Bacillus thuringiensis*.

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA CULTIVO DE *BTI* (ERLENMEYER)

A escolha do meio de cultura deve proporcionar a máxima produção com o mínimo custo (COACH,2000). Foram avaliados os efeitos de concentrações de glicose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrato de levedura e milhocina, no crescimento de Bti e TGY como amostra controle. Pode-se observar que os nutrientes testados aparentemente apresentaram capacidade de suprir nutricionalmente o crescimento da cepa de Bti. Os resultados do planejamento fatorial são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5-** Resultados do Delineamento Composto Central, com 3 pontos centrais para otimização de Bti

Ensaio	Concentração celular (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Esporos (%)
1	2,62	0,39	56
2	5,32	0,54	83
3	6,15	0,35	80
4	6,79	0,39	71
5	2,45	0,45	39
6	5,73	0,52	70
7	5,54	0,53	62
8	5,78	0,53	61
9	6,05	0,46	86
10	7,79	0,48	92
11	6,59	0,58	91
12	6,45	0,43	80
13	6,17	0,44	70
14	6,08	0,52	66
15	6,23	0,51	71
16	6,06	0,50	81
17	5,76	0,47	85
18	5,61	0,45	80
19	5,71	0,52	81
TGY	5,60	0,64	80

Fonte: o autor.

Os resultados de concentração celular, produtividade, assim como a contagem de esporos, foram obtidas com 16 horas de fermentação; esse tempo foi estipulado a partir de ensaios prévios, sendo suficiente atingir concentração máxima celular e para maturação dos esporos nas condições dos pontos centrais do delineamento, 30 °C , 170 rpm, 1% de inóculo e 7,0 pH inicial, relatados como adequadas para Bti em diversos trabalhos (VANDEKAR & DULMAGE, 1982; DULMAGE et al., 1990; PRIEST.,YOUSTEN,1991;ABDEL-HAMEED,1991)

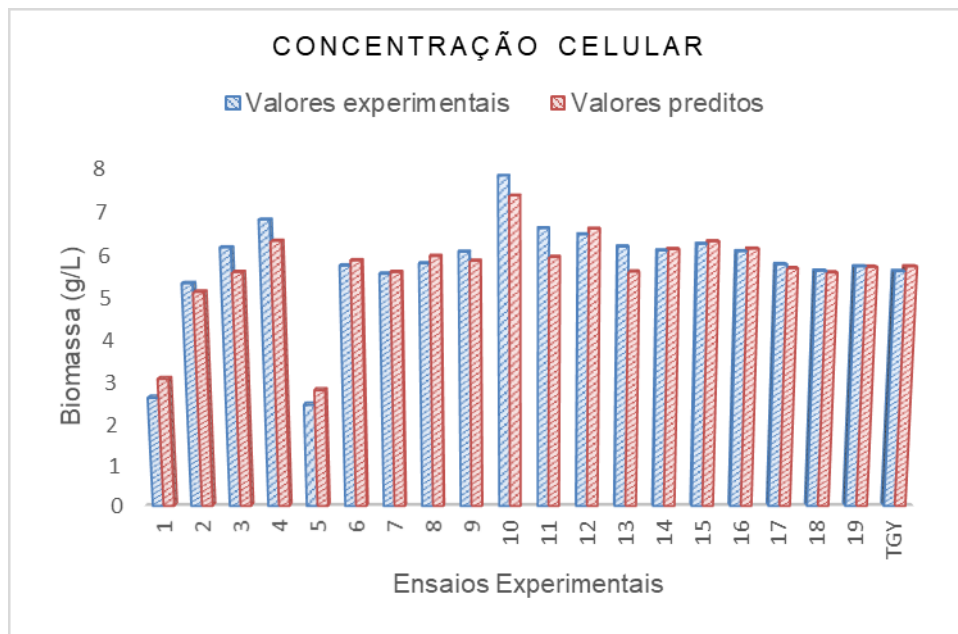
Embora tenha sido estudado diferentes fontes de nitrogênio para meio de cultura do microrganismo em questão, o trabalho visou a otimização do meio de cultura e taxas acima de 80% de esporulação levando-se em conta a propagação máxima celular, na qual foram as principais respostas obtidas para escolha do meio de cultura. Esses resultados foram delineados e avaliados através do software Protimiza Experimental, onde foi possível calcular o efeito de cada nutriente, bem como as significâncias entre eles. Os efeitos podem ser avaliados como a variação causada na resposta quando se percorre todos os níveis da variável (RODRIGUES; IEMMA,2005). Na prática os valores são calculados como a diferença entre a média das respostas nos níveis das variáveis (BARROS NETO et al.,1995).

O planejamento fatorial completo demonstra melhor resolução, auxiliando o estudo das interações entre as variáveis, já que todos os experimentos possíveis são realizados. Nessa etapa, o planejamento esquematizou a região próxima ao ponto central (g/L): 5 de glicose, 5 sulfato de amônio, 12,5 extrato de levedura e 22,5 milhocina.

Os melhores resultados foram obtidos no ensaio 10 com uma contagem de esporos acima de 90 %, e concentração celular de 7,79 g/L, os ensaios em que se utilizou o mais alto nível (+1) de concentração de milhocina e glicose e outros componentes, sulfato de amônio e extrato de levedura, em níveis (-1). O resultado menos expressivo foi no ensaio 5, com meio de cultura com níveis de extrato de levedura (+1) e os demais componentes com níveis (-1). Esta somatória de nutrientes seria baixa, tendo um efeito significativo para o cultivo de Bti, inibindo fortemente o crescimento celular e até mesmo a limitação de aeração do meio de cultura em Erlenmeyer em mesas agitadoras, conforme descrito por (VANDEKAR & DULMAGE (1982) e DULMAGE et al, 1990) autores relatam sobre as limitações da utilização de dessa vidraria na formulação de meios de cultura.

De modo geral, os resultados obtidos nos 19 ensaios de fermentação apresentaram baixa variabilidade entre si e ficaram próximos dos resultados obtidos nas fermentações utilizando meio TGY. Este resultado pode indicar que existe a possibilidade da substituição parcial dos nutrientes nitrogenados microbiológicos tradicionais (extrato de levedura e sulfato de amônio) por água de maceração do milho (milhocina). A avaliação da concentração celular dos experimentos realizados em Erlenmeyer utilizando os valores preditos em função dos valores experimentais obtidos estão apresentados no Gráfico 6.

**Gráfico 6-** Avaliação da concentração celular dos experimentos (DCC 2<sup>4</sup>) realizados em Erlenmeyer, utilizando valores preditos em função dos valores experimentais obtidos.



**Fonte:** o autor.

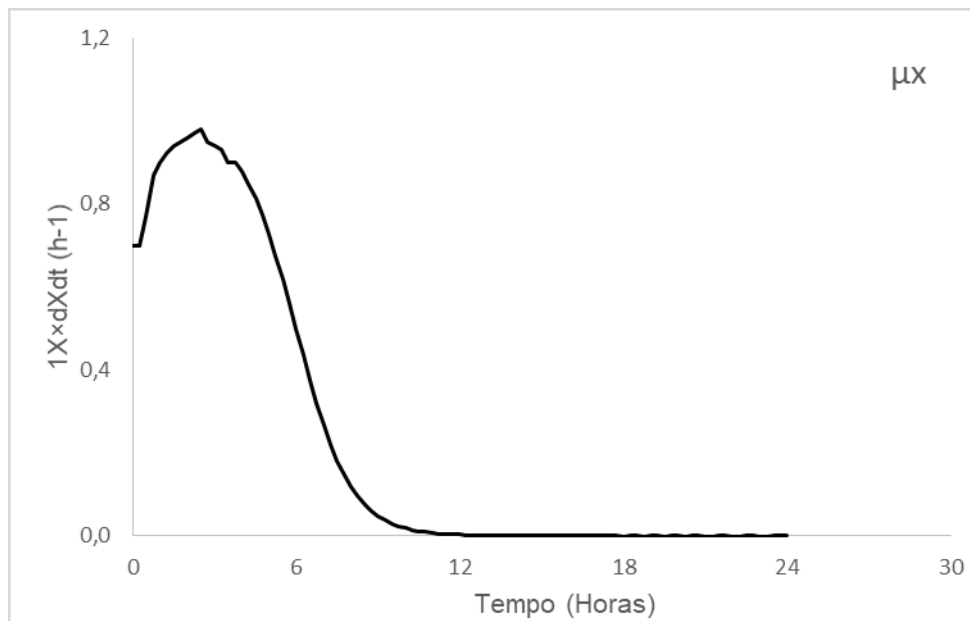
As principais fontes de nitrogênio avaliadas, extrato de levedura, milhocina e sulfato de amônio, apenas os nutrientes milhocina e sulfato de amônio exerceram efeitos positivos significativa sobre a concentração celular (y1) e esporulação (y3). Sendo que (y2) produtividade não apresentou significância perante as variáveis testadas.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA DO MICRORGANISMO

Considerando que a concentração celular aumenta com o decorrer da fermentação, a velocidade específica de crescimento bacteriano foi calculada para os experimentos em Erlenmeyer a fim de obter o pico máximo de conversão de biomassa por hora do microrganismo em estudo com seus propulsores meios de cultura.

De acordo o Gráfico 7, o Bti passou por um período de adaptação, chegando à sua velocidade específica máxima de crescimento após 2,5 h de cultivo. De todos os experimentos realizados o maior valor de velocidade específica ( $\mu_x$ ) foi de ( $0,98 \text{ h}^{-1}$ ), no experimento 10 a partir de milhocina e glicose, o valor determinado na fermentação, evidencia-se o ótimo crescimento de Bti a partir milhocina como fonte de nutriente.

**Gráfico 7-** Velocidade específica máxima de crescimento bacteriano.



**Fonte:** o autor.

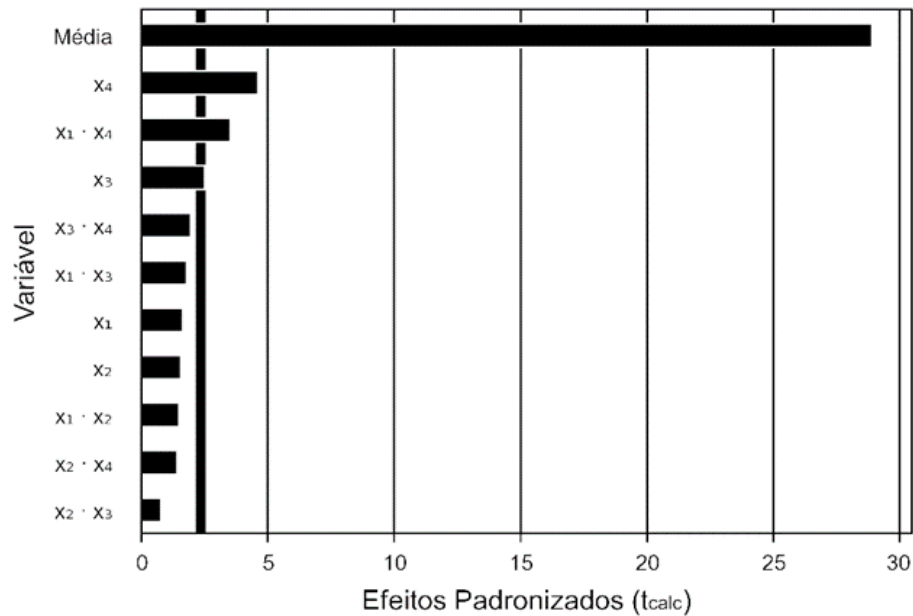
Com relação a velocidade específica ( $\mu x$ ), em meios formulados com extrato de levedura e sulfato de amônio, Rowe et al. (2003) relataram valores semelhantes, entre 0,42 a 0,67  $h^{-1}$ , enquanto Berbert-Molina et al. (2001) obtiveram valores em torno de 1,0  $h^{-1}$ , na qual podemos balizar com os dados obtidos experimentalmente.

## 5.5 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO CELULAR

A partir da análise do planejamento experimental de conversão de substrato em células, verifica-se que este foi significativamente influenciado tanto pelas condições de fermentações propostas, quanto pela interação entre as fontes de carbono e nitrogênio como substrato. A limitação mostrada no direcionamento de substrato para biossíntese e crescimento celular pode ser alcançada por meio do aumento da concentração inicial de fonte de nitrogênio alternativo combinado com a restrição da disponibilidade de glicose. Podemos considerar que os valores obtidos no experimento de crescimento celular variaram de 2,45 a 7,79 g/L.

A influência dos componentes utilizados no meio fermentado sobre o crescimento celular de Bti foi avaliado de acordo com o planejamento experimental. No Gráfico 8 estão apresentados os coeficientes de regressão linear e significâncias dos termos da equação obtidas para a resposta de crescimento celular. As variáveis que tiveram efeito significativo no crescimento celular, foram; (x4) milhocina, (x1.x4) glicose x milhocina, e (x3) extrato de levedura. Avaliando que a falta de ajuste não foi significativa, podemos concluir que o modelo se ajustou razoavelmente aos dados, ou seja o modelo matemático representa as tendências aproximadas de crescimento celular num processo fermentativo dentro das faixas experimentais representadas.

**Gráfico 8-** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos para crescimento celular obtidos por *Bacillus thuringiensis*.



Onde: X<sub>1</sub> - valor codificado para a variável glicose; X<sub>2</sub> - valor codificado para a variável sulfato de amônio; X<sub>3</sub> - valor codificado para a variável extrato de levedura; X<sub>4</sub> - valor codificado para milhocina.

**Fonte:** o autor.

A análise de variância (ANOVA) em função do modelo elaborado apresentou significância estatística através dos resultados experimentais para resposta de crescimento celular, cujo o *p*-valor foi < 0,01086 (Tabela 6). O valor de *F*<sub>calc</sub>, ao nível de confiança de 95 %, foi de 5,7 maior que o de *F*<sub>tab</sub> de 2,73, apontando a existência de diferenças significativas entre os tratamentos analisados. A dissolução mostra um coeficiente de correlação de  $R^2 = 87,62\%$ .

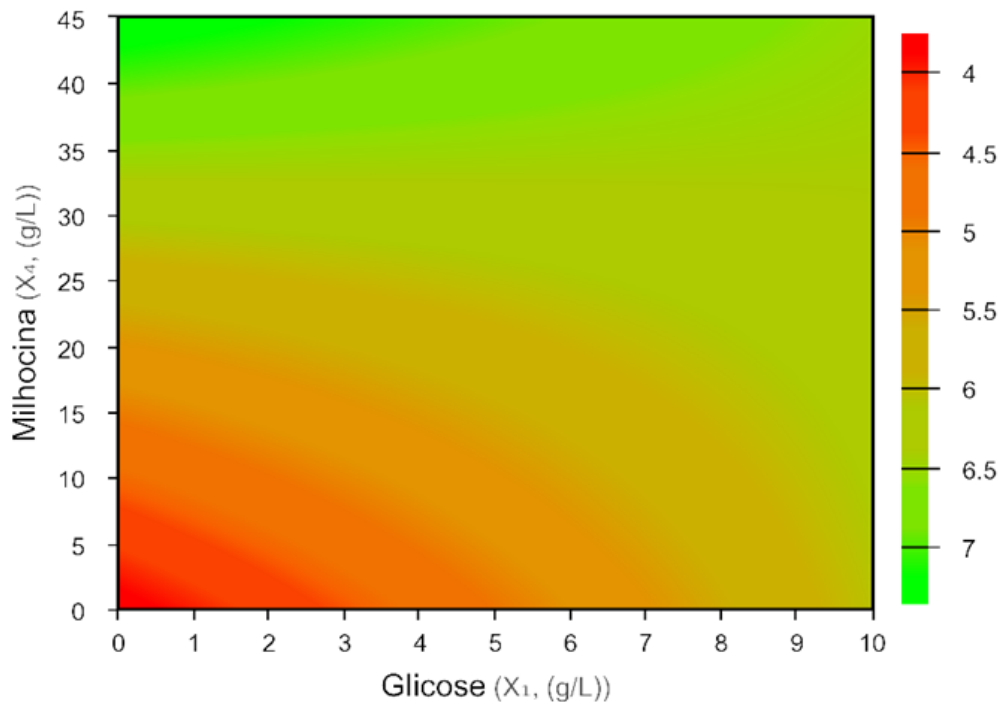
**Tabela 6-** Análise de variância dos resultados para a resposta de crescimento celular. Nível de significância ( $P < 0,05$ ).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	<i>F</i> <sub>calc</sub>	<i>p</i> -valor
Regressão	45,1	10	4,5	5,7	0,01086
Resíduos	6,4	8	0,8		
Falta de Ajuste	6,2	6	1,0	10,2	0,09207
Erro Puro	0,2	2	0,1		
Total	51,4	18			

**Fonte:** o autor.

Foi realizado uma representação dos dados entre as faixas experimentais, utilizando a Equação 2 (Item 4.5.2) fixando as variáveis sulfato de amônio ( $x_2$ ) e extrato de levedura ( $x_3$ ) em seus níveis intermediários (5,0 e 12,5 g/L), variando os níveis de glicose ( $x_1$ ) e ( $x_4$ ) milhocina. A resposta da análise em superfície de resposta está apresentada no Gráfico 9.

**Gráfico 9-** Superfície de resposta plana do crescimento celular com as variáveis glicose e milhocina.



**Fonte:** o autor.

Conforme pode ser observado, a superfície de resposta descreve a forte influência da concentração de milhocina sobre a glicose, sendo que a mesma demonstrou efeito significativo, porém sua disponibilidade no meio de cultura é fundamental, devido sua ação sobre a aceleração da fase exponencial e esporulação. No entanto, na região ótimo o crescimento celular predito médio foi 7,79 g/L, que demonstra o bom crescimento celular obtido. Os ensaios de repetição ponto central (17,18 e 19) apresentaram valores satisfatórios e aproximados, por se tratar das mesmas amostras, assim como experimento 20 (TGY) manteve concentrações entre os pontos centrais.

Alguns trabalhos citam a utilização de matérias primas nativas e resíduos da agroindustrial como meio de cultura, com excelentes resultados e a custos reduzidos (OBETA & OKAFOR, 1984; EJIFOR & OKAFOR, 1989; ABDEL-HAMED et al., 1990b e 1991; SALAMA & MORRIS, 1993). A utilização de nitrogênio no meio de cultura para produção de *Bacillus thuringiensis* é importante na biossíntese para crescimento celular e esporulação (SALAMA et al., 1983; PEARSON & WARD, 1988).

Tendo em vista a influência de diferentes variáveis, o desenvolvimento de meios de cultivo para a produção de Bti é bastante complexo. Além disso, há uma variação muito grande de uma linhagem para outra, o que, muitas vezes, dificulta a extrapolação dos resultados em um trabalho.

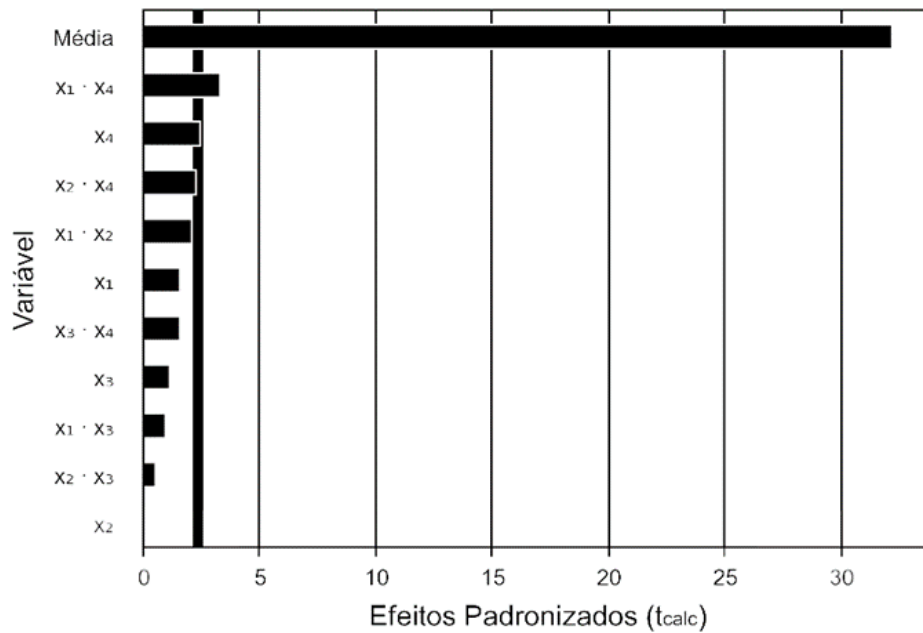
## 5.6 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO NA TAXA DE ESPORULAÇÃO

Avaliando que a produção de esporos é uma medida indireta da multiplicação celular máxima do Bti e, portanto, da produção do cristal proteico, estão relacionados diretamente ao crescimento celular obtido, sendo que as respostas vão depender das condições de fermentação e do meio de cultura em que o microrganismo se desenvolve. Podemos considerar que as contagens realizadas de esporos (cerca de 39 a 92 %) nos ensaios realizados, estão dentro das faixas aceitáveis.

No Gráfico 10, são apresentados os coeficientes de regressão e significâncias dos termos da equação obtida para resposta de taxa de esporulação. As variáveis que tiveram efeitos significativos na taxa de esporos, foram;  $(x_1.x_4)$  glicose x milhocina,  $(x_4)$  milhocina,  $(x_2.x_4)$  sulfato de amônio x milhocina e  $(x_1.x_2)$  glicose x sulfato de amônio. Avaliando-se que a falta de ajuste não foi significativa, pode-se dizer que o modelo se ajustou razoavelmente aos dados, ou seja, o modelo matemático representa as tendências aproximadas das taxas de esporos (%) num processo fermentativo dentro das faixas experimentais representadas.



**Gráfico 10-** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos para esporulação obtidos por *Bacillus thuringiensis*.



X<sub>1</sub> - valor codificado para a variável glicose; X<sub>2</sub> - valor codificado para a variável sulfato de amônio; X<sub>3</sub> - valor codificado para a variável extrato de levedura; X<sub>4</sub> - valor codificado para milhocina.

**Fonte:** o autor.

O modelo se ajusta aos dados experimentais com uma significância de 0,04, onde os termos de falta de ajuste apresentaram significância 0,18 contribuindo significativamente ao modelo. A dissolução mostra um coeficiente de correlação de  $R^2 = 87,99\%$ . Os dados da análise variância para a contagem de esporos de Bti estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7-** Análise de variância dos resultados para a resposta contagem de esporos (%) dos efeitos de concentração do meio.

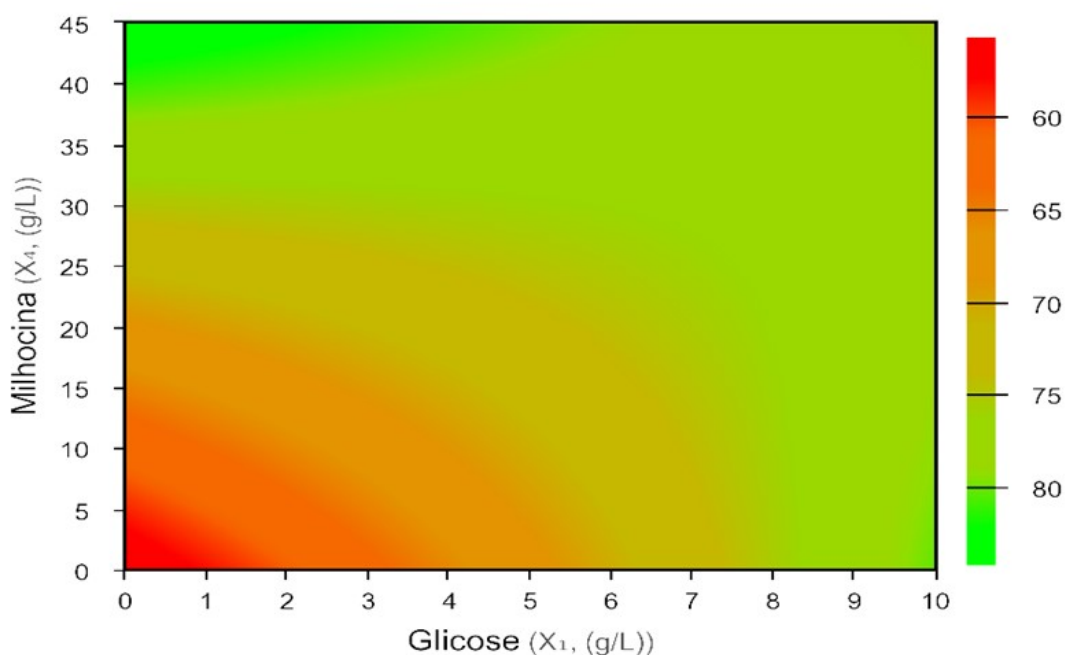
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Regressão	5647,6	10	564,8	5,9	0,0475
Resíduos	770,9	8	96,4		
Falta de Ajuste	696,9	6	116,2	3,1	0,18122
Erro Puro	74,00	2	37,0		
Total	6418,5	18			

Nível de significância (P<0,05)

**Fonte:** o autor.

Foi realizado uma representação dos dados entre as faixas experimentais, utilizando a Equação 3 (Item 4.6.4), fixando as variáveis sulfato de amônio ( $x_2$ ) e extrato de levedura ( $x_3$ ) em seus níveis intermediários (5,0 e 12,5 g/L), variando os níveis de glicose ( $x_1$ ) e ( $x_4$ ) milhocina. A resposta da análise em superfície de reposta obtida é apresentada no Gráfico 11.

**Gráfico 11**-Superfície de resposta plana para taxa de esporos (%), com as variáveis glicose e milhocina.



**Fonte:** o autor.

Entre as variáveis testadas, a milhocina apresentou o termo quadrático altamente significativo e positivo; o que indica que esta fonte influenciou muito na esporulação do fermentado. A região ótima, representado em verde, está no sentido de aumento da concentração da milhocina. No entanto, na região ótima a esporulação média foi 84,11 %, o que indica uma boa maturação e esporulação.

Estes resultados das contagens encontram-se dentro das faixas aceitáveis para estes processos; diversos trabalhos reportam estes níveis de esporulação. Os resultados estão de acordo com KUPPUSSAMY & BALARAM (1991) que relatam os efeitos benéficos da milhocina nos rendimentos celulares e esporulação no cultivo de *Bacillus thuringiensis*.

A fonte de nitrogênio tem grande influência sobre a formação do cristal proteico de Bti (IÇGEN; IÇGEN; ÖZCENGİZ, 2002). A existência de fontes de nitrogênio no meio essencial para o crescimento da bactéria e a formação das toxinas (ANDERSON; JAYARAMAM, 2003). Estudos de alguns autores mostram que é necessário o uso tanto de fonte orgânica quanto inorgânica de nitrogênio, no qual o uso apenas de fontes de nitrogênio inorgânica no cultivo de Bti, houve diminuição no crescimento celular e principalmente na esporulação. Dentre as fontes de nitrogênio inorgânico o sulfato de amônio é o mais empregado (SIKDAR et al., 1991; MIGNONE; AVIGNONE-ROSSA, 1996).

Fontes de nitrogênio orgânico como o extrato de levedura, é muito empregado para cultivo de Bti. Porém, peptona e derivados do milho vem apresentando resultados satisfatórios. (VORA; SHETNA, 1999; IÇGEN; IÇGEN; ÖZCENGİZ, 2002B; MORRIS; DEAN, 1997). De acordo com Anderson e Jayaraman (2003) verificou que concentrações de extrato de levedura resultaram na população heterogênea de células vegetativas, células esporuladas e esporos no final do cultivo foram prejudicados. Além disso, o processo de lise celular e liberação de esporos, por terem afetado negativamente a síntese de componentes do esporo.

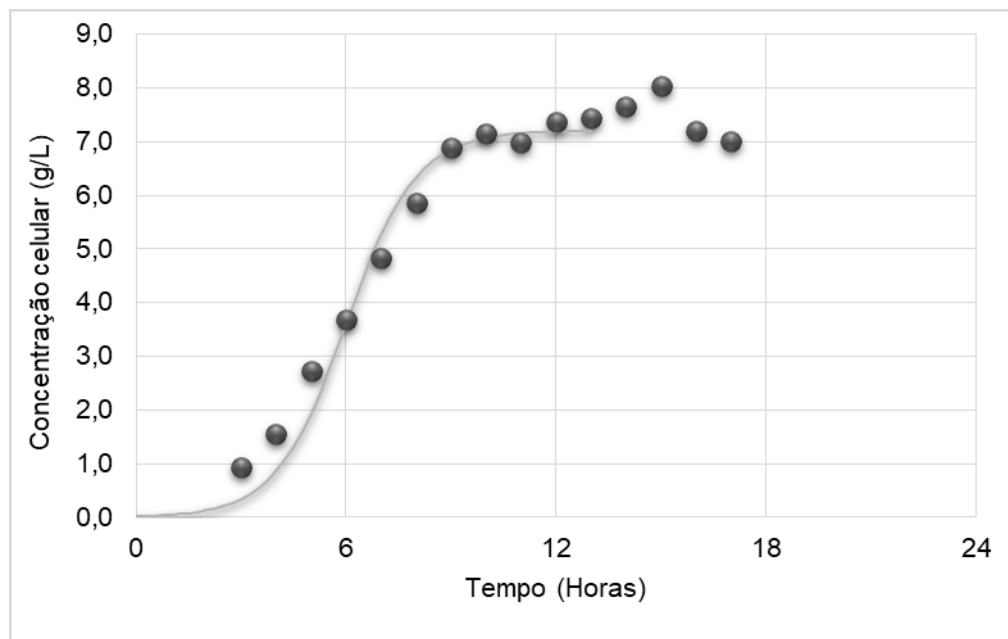
A fonte de carbono para cultivo de Bti depende do objetivo da fermentação assim como a linha de espécie de trabalho. Diversos trabalhos revelam que à melhor fonte para crescimento vegetativo não corresponde a melhor fonte de esporulação (ÖSKAN et al., 2003). De acordo com Içgen, Içgen e Özcengiz (2002b) demonstram um efeito inibidor de altas concentrações de glicose durante a sínteses proteicas. Segundo Madigan et al. (1997) o Bti tem maior afinidade para metabolizar glicose, sendo essa fonte de energia mais adequada para o crescimento deste microrganismo.

## 5.7 AVALIAÇÃO DO CULTIVO EM FERMENTADOR PILOTO

O ensaio 10, realizado em Erlenmeyer do planejamento fatorial (DCC) 2<sup>4</sup> apresentou melhor resultado quanto a produção de biomassa e esporulação, sendo, portanto, a composição do respectivo meio de cultura foi adotada para testar no fermentador piloto. A fermentação foi realizada conforme descrito anteriormente, sendo coletada periodicamente uma amostra do meio fermentado para avaliação concentração celular e microscopia. Os dados obtidos de curva de crescimento celular em biorreator piloto estão apresentadas no Gráfico 12. Avaliando-se a curva de

crescimento celular de Bti, pode-se observar que a " fase lag" foi mais extensa no cultivo realizado em meio contendo proposto fonte de nitrogênio, milhocina como suplemento nutricional. Nesta fermentação, a concentração celular aumentou gradativamente ao longo das 16 h de cultivo, atingindo valores de 8,02 g/L, assim uma esporulação de 86 % e produtividade de 0,50 g/L. h.

Gráfico 12- Monitoramento da concentração celular de Bti em fermentador piloto



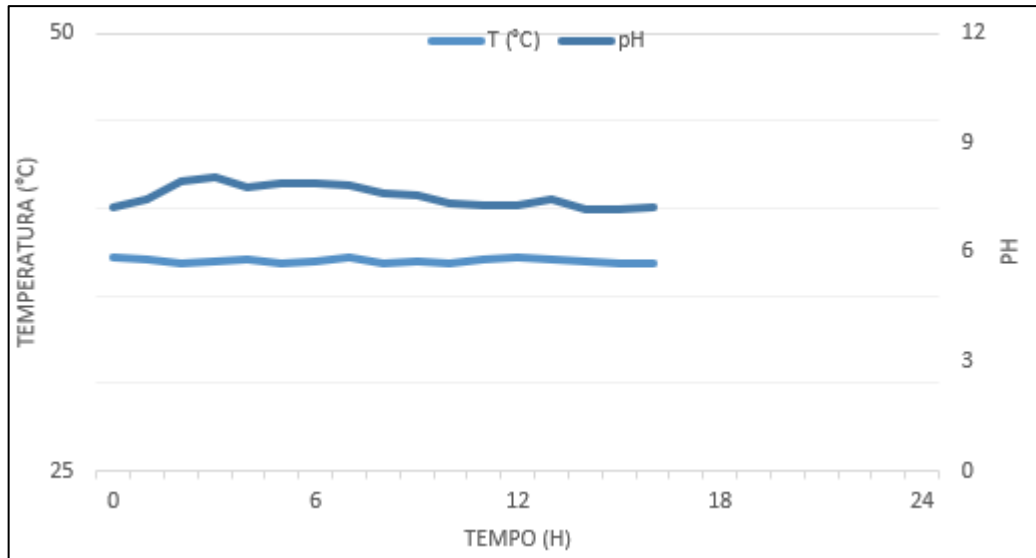
**Fonte:** o autor.

Os valores de pH e temperatura foram monitorados ao longo de 16 h no fermentador em escala piloto. Em geral, os valores de uma cultura de Bti, quando há nenhum mecanismo de controle divergente, iniciam o pH em torno de 7 diminuindo-se para 6 durante o cultivo e esporulação. Com o término da esporulação e lise celular o pH sobe para neutro e até mesmo básicos (LUNA *et al.*,2004).

No presente estudo não foi observado a queda inicial de pH que geralmente ocorre em cultivos de Bti (Gráfico 13). Provavelmente isto ocorreu devido ao meio de cultura, ou à baixa concentração de glicose no meio de cultura, a qual resultou numa menor formação de ácidos orgânicos responsáveis pela queda do pH (CHANG *et al.*,2008). A utilização de sais como ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) no meio podem funcionar

como agente tamponante contra a variação no pH, dificultando a percepção dessa variação no início do processo fermentativo.

**Gráfico 13-** Controle do processo no fermentador piloto



**Fonte:** o autor

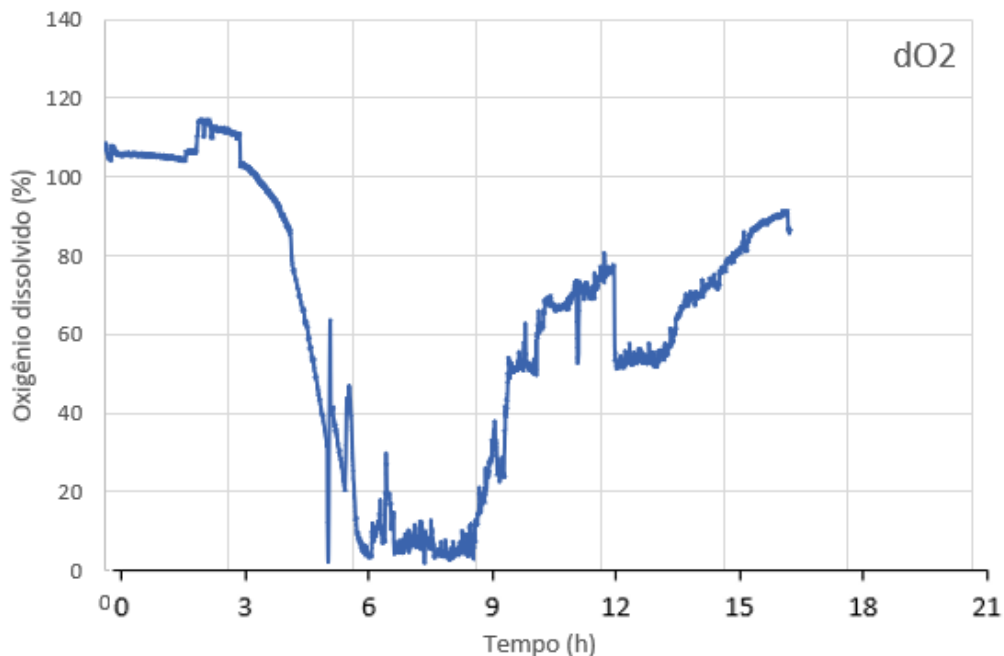
Öskan *et al.* (2002) sugerem trabalhar com pH  $7,0 \pm 0,3$  como a melhor faixa para o crescimento celular e produção de toxinas por Bti, devido algumas proteínas Cry, em especial a Cry4Ba, se apresentarem mais sensíveis às variações de pH. Já os estudos de İçgen *et al.* (2002) sugerem produzir Bti entre faixas de pH variando 5,5 a 6,5. Outros autores relatam que as variações de pH entre 6,5 a 8,0 são insignificantes para produção de toxinas (HOLMBERG, R *et al.*, 1887 Apud IÇGEN *et al.* 2002). Estes relatos corroboram com os resultados obtidos neste estudo. Não foram observadas variações significativas de pH, uma vez que o mesmo foi controlado pelo sistema automatizado do fermentador piloto (dosados ácido fosfórico e hidróxido de sódio para ajuste de pH).

Segundo Bernhard & Utz (1993), a faixa de temperatura em que ocorre o crescimento de Bti fica em torno de 15° a 45°C, sendo que os valores ótimos para crescimento e esporulação do Bti encontram-se entre 25° e 35°C. Já İçgen *et al.* (2002) observam que a faixa ideal fica entre 25° e 37°C, sendo que a maior produção de Cry

4Ba foi observada quando o cultivo foi conduzido a 35°C, apesar de esta temperatura ser considerada baixa para o crescimento de Bti.

Durante o experimento no fermentador piloto o teor de oxigênio dissolvido no meio reduziu progressivamente a partir da terceira hora (Gráfico 14). Indicando que a demanda de oxigênio pelo cultivo a partir daquele momento era superior que a capacidade de suprimento proporcionado pelo sistema. Esta redução no nível de oxigênio disponível no meio coincide com a fase de crescimento exponencial bacteriano, onde se tem maior concentração celular.

**Gráfico 14-** Monitoramento do oxigênio dissolvido no fermentador piloto.



**Fonte:** o autor.

O fornecimento de oxigênio no cultivo de Bti é de suma importância para o crescimento, a esporulação e a produção de endotoxinas (Dulmage, 1989). Segundo Avignone-Rossaet *al* (1992) obtiveram sucesso com crescimento celular, formação de esporos e produção de toxina similares, quando houve alta disponibilidade de oxigênio no meio fermentado, mostrando-se essencial para o cultivo. Kraemer-Shafhalter & Moser (1996) relatam que a concentração de oxigênio dissolvido ideal para crescimento e esporulação de BTI ficam em torno de 26% em relação a saturação. Já Berbert-Molina (1998) descreve que no cultivo de Bti a concentração deste

componente no meio de cultivo deve ficar acima da concentração crítica para o microrganismo para que o crescimento e a esporulação do microrganismo não sejam prejudicados.

## 5.8 ANÁLISE ECONÔMICA DO MEIO DE CULTIVO OTIMIZADO

O trabalho teve como objetivo estabelecer um meio de cultura em condições ideais de fermentação da bactéria *Bacillus thuringiensis* para obtenção de esporos. Na Tabela 8, pode-se avaliar que os resultados são satisfatórios comparando os valores de concentração celular tanto na experimentação em Erlenmeyer quanto os valores obtidos em fermentação piloto, obtendo-se uma diferença de 0,23 g/L de biomassa. A formação de esporos não foi satisfatória resultando em -6 %, já a produtividade não apresentou uma diferença significativa comparando os dados.

**Tabela 8-** Análise comparativa entre os resultados obtidos para os diferentes processos fermentativos.

<b>Experimentos (Resultados)</b>	<b>Concentração celular (g/L)</b>	<b>Produtividade (g/L.h)</b>	<b>Esporos (%)</b>
Amostra 10 (Erlenmeyer)	7,79	0,48	92
Valores preditos	7,34	0,49	87
Valores obtidos no fermentador	8,02	0,50	86

Fonte: o autor.

Como a proposta desse trabalho era a otimização das condições do cultivo de *Bacillus thuringiensis* visando a diminuição do custo de produção dos esporos mantando a qualidade do produto, após otimizadas as condições fez-se uma análise de custo da produção. A Tabela 9 apresenta o meio adaptado e o meio otimizado com milhocina.

**Tabela 9-** Análise econômica comparativa entre os meios de cultivo adaptado e otimizado com milhocina.

<b>Custos/Meios</b>	<b>Meio Adaptado</b>	<b>Meio milhocina otimizado</b>
Mistura de sais R\$	17	17
Extrato de levedura R\$	25,5	3,4
Sulfato de Amônio R\$	6,0	12
Milhocina R\$	NA	8
Glicose R\$	15	1,3
Custo total (100L) R\$	69,5	35,7

Fonte: o autor

Pode-se observar uma diferença considerável entre os custos do meio de cultura adaptado e meio otimizado com milhocina. Essa diferença é explicada quando se observa os componentes do meio onde são visíveis suas diferenças economicamente, principalmente fontes de carbono e nitrogênio alternativos.

O meio otimizado com milhocina corresponde a uma economia 51,36 % comparando ao meio adaptado, o que representa um ganho bastante considerável quando se pensa em produção industrial.



## 6 CONCLUSÕES

Obteve-se nesse trabalho, que o caldo fermentado com esporulação acima de 80 % e ótima concentração celular, utilizando como substrato fontes alternativas de nitrogênio proveniente de meios industriais de biorefinaria, na qual o resultado se torna bastante interessante em termos de produção industrial, visto que o processo se tornou economicamente viável.

Foi possível, mais uma vez, comprovar o quão útil se torna a metodologia de planejamento experimental quando deseja-se estudar diversas variáveis e suas possíveis interações dos compostos estudados.

Entre as fontes de nitrogênio estudadas (extrato de levedura, milhocina e sulfato de amônio), a milhocina foi a mais adequada para produção de biomassa e esporulação.

Para otimização do meio de cultura para *Bacillus thuringiensis* foi realizado experimentos em Erlenmeyer aplicando planejamento experimental DCC 2<sup>4</sup>, obtendo-se concentração celular máxima de 7,79 g/L e esporulação de 92 % com uma concentração de milhocina de 40 g/L; glicose 1 g/L; extrato de levedura 2g/L; sulfato de amônio 5g/L no experimento 10.

Em função do melhor resultado obtido no experimento em Erlenmeyer e visando um menor custo de produção, foi realizado experimento em fermentador piloto utilizando as concentrações do meio otimizado, conseguiu-se obter uma concentração celular de 8,02 g/L e esporulação de 86 %

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, A. A stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal: mathematical modeling and scale up studies. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 857-861, 2001.
- ABIB - Associação Brasileira das Indústrias de Biomassa e Energia Renovável. Potencial de Biomassa Energética no Brasil. Curitiba: ABIB, p.58, 2012.
- ABIOGÁS – Associação Brasileira de Biogás e de Biometano. Proposta de Programa Nacional do Biogás e do Biometano - PNBB. São Paulo: 2015. p. 69, 2015
- ABIOVE - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Cadeia Produtiva de Oleaginosas e Biodiesel: estatística. São Paulo: ABIOVE, 2017. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>. Acesso em: 29 abr. 2017.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004 - Classificação de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro, 2004.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6027-6032, 1995.
- AKHTAR, M. An overview of biomechanical pulping research in: Raymond, A. Young.; AKHTAR, M. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley and Sons. p. 309-339, 1998.
- ALBEROLA, C.; LICHTFOUSE, E.; NAVARRETE, M.; DEBAEKE, P.; SOUCHÈRE, V. *Bacillus thuringiensis*: Applications in Agriculture and Insect Resistance Management - A Review. **Italian Journal of Agronomy**, v. 3, n. 3, p. 77-78, 2008.
- ALI, S.; ZAFAR, Y.; ALI, G. M.; NAZIR, F. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, n. 9, v. 14, p. 2022-2031, 2010.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2ed. Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Piracicaba, p.1163, 1998.
- ANDERSON, R.K.I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. galleriae for biopesticide

production. **Chemical and Biochemistry Engineering Quarterly**, v.17, n.3, p.225-231, 2003.

ANDRADE, E. Efeito dos nutrientes e inoculo na biossíntese dos cristais protéicos de *Bacillus thuringiensis* var israelenses. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade estadual de Londrina, p. 39, 2005.

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

ANGUELOV, R.; DUFOURD, C.; DUMONT, Y. Mathematical model for pest–insect control using mating disruption and trapping. **Applied Mathematical Modelling**, v. 52, p. 437-457, 2017.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. Brasília, p. 45, 2016.

ARAI, T.; IKEDA, K.; AKIYAMA, H.; TSUCHIYA, K.; IRITANI, S.; ISHIGURO, K.; YAGISHITA, S.; ODA, T.; ODAWARA, T.; ISEKI, E. Different immunoreactivities of the microtubule-binding region of tau and its molecular basis in brains from patients with Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. **Acta neuropathologica**, v. 105, n. 5, p. 489-498, 2003.

ARATA, A. A. The developing role of microbiological agents in vector control. **Experientia**, v. 33, n. 1, p. 125-130, 1977.

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.

AVIGNONE-ROSSA, C.; ARCAS; J. MIGNONE, C. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Growth, Sporulation and d-endotoxin Production in Oxigen Limited and No-limited cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 301-304, 1992.

BADRAN, A. H.; GUZOV, V. M.; HUAI, Q.; KEMP, M. M.; VISHWANATH, P.; KAIN, W.; NANCE, A. M.; EVDOKIMOV, A.; MOSHIRI, F.; TURNER, K. H. Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. **Nature**, v. 533, p. 58-63, 2016.

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

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, v. 6, p.1222-1243, 2014.

BERBERT-MOLINA, M. A.; PRATA, A. M. R.; PESSANHA, L. G.; SILVEIRA, M. M. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35., p. 1397-1404, 2008.

BERBET-MOLINA, M.A.; SATO, S.; SILVEIRA, M.M. (2001). Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio semi-sintético: simulação matemática de crescimento. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia. **Anais**. São Paulo, p.178-183, 2001.

BERBET-MOLINA, M.A. Estudo da influência do suprimento de oxigênio e da concentração de glicose sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS 82 em regime descontínuo. **Tese de doutorado**. Área de Tecnologia em Fermentações, Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil, 1998.

BERNHARD, K.; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* Inseticides for Experimental and Commercial Uses. In: Entwistle. P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higss, S. *Bacillus thuringiensis*, **An environmental biopesticide: Theory and Practice**. . 2 nd ed. Chilchester, England: John Willey & Sons, Inc. p.256-267, 1993.

BERGAMASCO, V. B.; GONÇALVES, J. F.; POLANCZYK, R. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. Expression of a new *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia gene in *Escherichia coli* with Strong Activity Against Cotton Pests. **Aust. J. Basic. Appl. Sci.**, v. 5, n. 12, p. 526-533, 2011.

BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 152-158, 2013.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, p. 843-850, 2003.

BOLTER, C. J.; JONGSMA, M. A. Colorado Potato Beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) Adapt to Proteinase-Inhibitors Induced in Potato Leaves by Methyl Jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 12, p. 1071-1078, 1995.

BOUKEDI, H.; SELLAMI, S.; KTARI, S.; HASSAN, N. B. B.; TOUNSI, S.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; ABDELKEFI-MESRATI, L. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. **Microbiological Research**, v. 186, p. 9-15, 2016.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode de action of *Bacillus thuringiensis* Cry e Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

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

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, p.423-431, 2011.

CANTÓN, P. E.; REYES, E. Z.; DE ESCUDERO, I. R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, v. 32, p. 595-600, 2011.

CÁNTON, P. E.; CANCINO-RODEZNO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A.; Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1042, 2015.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CENBIO - Centro Nacional de Referência em Biomassa. **Atlas de Bioenergia do Brasil**. 2. ed. São Paulo: CENBIO, p.66, 2012.

CERLETTI, C.; DE CURTIS, A.; BRACONE, F.; DIGESÙ, C.; MORGANTI, A. G.; IACOVIELLO, L.; DONATI, M. B. Dietary anthocyanins and health: data from FLORA and ATHENA EU projects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 103-106, 2017.

CHANG, M.; ZHOU, S. G.; LU, N.; NI, J. R. Starch processing wastewater as a new medium for production of *Bacillus thuringiensis*. **World J Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 441-447, 2008.

CÍNTIA, P. **Influência de parâmetros operacionais, fontes protéicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus Thuringiensis var. israelenses***. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, f.48, 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2016/2017**. Brasília: CONAB, v. 4, n. 5, p.166, 2017.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.

CORRÊA, R. F. T.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  $\delta$ -endotoxins towards insect and mammalian cells. **PloS One**, v. 7, p. 46121, 2012.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CONTE, O.; TEIXEIRA DE OLIVEIRA, F.; HARGER, N.; SPALDING CORRÊA-FERREIRA, B. **Resultados do Manejo Integrado de Pragas da Soja na Safra 2013/14 no Paraná**. Embrapa Soja: Londrina, 2014.

COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, V. F. M.; DESIDÉRIO, J. A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* à larvas de *Aedes aegypti* (l.) (Diptera: culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 757-766, 2010.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, A. O.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 79-87, 2014.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 249-254, 1995.

CRICKMORE, N. 2017 full list of delta-endotoxins. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 22 de Agosto de 2018.

CRICKMORE N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acesso em: 5 de Novembro de 2018.

DA SILVA, R.; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from espore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409-433, 2003.

DOMINGOS, M. Estudo de crescimento de ceripo reapsis subvermispora em culturas submerses para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena. p.23-25, 2009.

DULMAGE, H.T.; YOUSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/WORLD BANK/WHO **Special Program for Research and Training in Tropical Diseases**, p.42, 1990.

EL-KERSH, T. A.; AHMED, A. M.; AL-SHEIKH, Y. A.; TRIPET, F.; IBRAHIM, M. S.; METWALLI, A. A. M. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 647, 2016.

ELLEUCH, J.; TOUNSI, S.; HASSEN, N. B. B.; LACOIX, M. N.; CHANDRE, F.; JAOUA, S.; ZGHAL, R. Z. Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.124, p. 90-97, 2015.

ESCUADERO, I. R.; ESTELA, A.; POCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J. A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4796-4804, 2006.

ESPINDOLA, R. **Sequência completa do gene cry1Ia do isolado T 01 328 de *Bacillus thuringiensis* proveniente do solo de Cubatão (SP-Brasil)**. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 55 f, 2003.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FAO - Organização das Nações Unidas. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/fao-brasil-substituira-eua-como-terceiro-maior-fornecedor-mundial-de-oleo-de-soja/>>. Acesso em 16 de Julho de 2018.

FERNANDES, W. D.; FERRAZ, J. M. G.; FERRACINI, V. L.; HABIB, M. E. M. Deterrença alimentar e toxidez de extratos vegetais em adultos de *Anthonomus grandis* Boh.(Coleoptera: Curculionidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 553-556, 1996.

FERNANDEZ-LUNA, M. T.; LANZ-MENDOZA, H.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; MIRANDA-RIOS, J. An  $\alpha$ -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 746-757, 2010.

FERRARI, A. **Agrotóxico: a praga da dominação**. Porto Alegre: Mercado Aberto, p. 110-112, 1986

FIGUEIREDO, C. S.; MARUCCI, S. C.; TEZZA, R. I. D.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Caracterização do gene vip3A e toxicidade da proteína Vip3Aa50 à lagarta-do-cartucho e à lagarta-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1220-1227, 2013.



FRANKENHUYZEN, K. V. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 76-85, 2013.

GALZER, E. C. W.; AZEVEDO FILHO, W. S. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 1, p. 13-16, 2016.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 76-82, 2008.

GIANETTI, B. F.; DEMÉTRIO, J. F. C.; BONILLA, S. H.; AGOSTINHO, F.; ALMEIDA, C. M. V. B. Emergency diagnosis and reflections towards Brazilian sustainable development. **Energy Policy**, v. 63, p. 1002-1012, 2013.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chicester: John Wiley, p. 319, 2000.

GUO, S.; ZHANG, C.; LIN, X.; ZHAN, Y.; HE, K.; SONG, F.; ZHANG, J. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Protein Expression and Purification**, v. 78, p. 204-208, 2011.

GUTTMANN, D. M.; ELLAR, D. J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 7-13, 2000.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênica. In: ALVES, S.B. (ed) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 383-446, 1998.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 78-81, 2013.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p. 219-225, 2009.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

HYVÄRINEN, E.; KOUKI, J.; MARTIKAINEN, P. A comparison of three trapping methods used to survey forest-dwelling Coleoptera. **European Journal of Entomology**, v. 103, n. 2, p. 397-407, 2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. **Valor da produção agrícola nacional em 2016 foi 20% maior do que em 2015**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-denoticias/releases/16814-pam-2016-valor-da-producao-agricola-nacional-foi-20-maiordo-que-em-2015.html>>. Acesso em: 02-de Outubro de 2018.

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, 2002.

IPARDES - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caderno Estatístico do Município de Londrina 2018**. Londrina: IPADES, p.45 p, 2018.

KRAEMER-SCHAFHALTER, A.; MOSER, A. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab-scale batch process. **Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 139-144, 1996.

KUMAR, S.; CHANDRA, A.; PANDEY, K. C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, p. 641-653, 2008.

LAGNAOUI, A.; CAÑEDO, V.; DOUCHES, D.S. Evaluation of *Bt-cry1Ia1*(cryV) transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. **CIP Program Report 1999 – 2000**, p. 117–121, 2001.

LEE, B. H.; KIM, B. K.; LEE, Y. J.; CHUNG, C. H.; LEE, J. W. Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 38-42, 2010.

LEUBER, M.; ORLIK, F.; SCHIFFLER, B.; SICKMANN, A.; BENZ, R. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. **Biochemical**, v. 45, p. 283-288, 2006.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., p. 43, 2001.

LIMA, G. M. S. Proteínas Bioinseticidas Produzidas por *Bacillus thuringiensis*. In: **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 119-137, 2010.

LIU, K. Y.; ZHENG, B. L.; HONG, H. Z.; JIANG, C. F.; PENG, R.; PENG, J. X.; YU, Z. H.; ZHENG, J.; YANG, H. Characterization of cultured insect cells selected by *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 40, p. 312-317, 2004.

LIU, Q.; HALLERMAN, E.; PENG, Y.; LI, Y. Development of *Bt* rice and *Bt* maize in China and their efficacy in target pest control. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1561, 2016.

LOSS, E.; ROYER, A. R.; BARRETO-RODRIGUES, M.; BARANA, A. C. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. Mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2-3, p. 1522-1525, 2009.

LUNA, C. L.; SILVA, G. R.; RIOS, E. M. M. M. *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* production involving re-use of the Supernatant. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 143-145, 2004.

MADEJ, K.; KALENIK, T. K.; & PIEKOSZEWSKI, W. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. **Food Chemistry**, v. 269, p. 527-541, 2018.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (Eds.) **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição. Porto Alegre: Artmed, p. 1032, 2010.

MALAJOVICH, M. A. **Biotechnologia**. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia, p. 320, 2012.

MARTIN, P. A.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2437-2442, 1989.

MARTINS, E. S.; AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FLACÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

MARTINS, E.S. **Estudo da atividade de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para inseto-praga do algodoeiro**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 158 f., 2009.

MARUCCI, S. C. Seleção e caracterização de novos genes vip3A: genes inseticidas de segunda geração de *Bacillus thuringiensis*. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 64 f., 2010.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil - projeções do agronegócio 2012/2013 a 2022/2023**. Brasília: MAPA, p. 96, 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Agrícola e Pecuário. Período base 2014/2015**. Brasília: MAPA, p. 92, 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Agrícola e Pecuário. Período base 2015/2016**. Brasília: MAPA, p. 50, 2016.

MENDELECK, E. Patologia e alterações histológicas causadas por *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* em cinco coleópteros pragas de cereais armazenados. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. UNICAMP, Campinas, 116 f., 1993.

MENEGASSI, B. Extrusão de farinha de mandioca-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 4, p. 252-285, 2007.

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

NONHEBEL, S. Energy from agricultural residues and consequences for land requirements for food production. **Agricultural Systems**, v. 94, n. 2, p. 586-592, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, p.1-7, 2008.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. DE N.; DA MATTOS, R. DE C. O.; MOREIRA, J. C. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p.130-135, 2001.

ÖSKAN, M.; DILEK, F. B.; YETIS, Ü.; ÖZCENGİZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Research in Microbiology**, v. 18, p. 209-216, 2002.

OTIENO-AYAYO, Z. N.; ZARITSKY, A.; WIRTH, M. C.; MANASHEROB, R.; CAHAN, R.; KHASDAN, V.; BEN-DOV, E. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2191-2199, 2008.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil – parasitóides e predadores**. Piracicaba: Ed. Manole, p. 609, 2002.

PEFEROEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 173-177, 1997.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books, v. 2, p. 22-40, 1996.

PETROVSKII, S.; BEARUP, D.; AHMED, D. A.; BLACKSHAW, R. Estimating insect population density from trap counts. **Ecological Complexity**, v. 10, p. 69-82, 2012.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N. P.; SILVA, A. C. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, 2014.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. DE S. E, LARA, S. S. DE, CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. DA C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

POLANCZYK, R.; ALVES S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociência**, v. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R. A.; ROGÉRIO, F. P.; FIUZA, L. M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 209-214, 2004.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R.; Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10 p. 6276-6281, 2005.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 189-194, 2010.

REYAZ, A. L.; GUNAPRIYA, L.; ARULSELVI, P. I. Molecular characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Kashmir valley. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 143, 2017.

RIZVI, S. A. H.; LING, S.; TIAN, F.; XIE, F.; ZENG, X. Toxicity and enzyme inhibition activities of the essential oil and dominant constituents derived from *Artemisia absinthium* L. against adult Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 468-475, 2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. revisada e ampliada. Campinas: Casa do Pão, p. 125-133, 2009.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: **Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento De Resíduos Agropecuários e Agroindustriais**. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira dos Especialistas em Resíduos das Produções Agropecuária e Agroindustrial (SBERA), 2011.

ROWE, G. E.; MARGARITIS, A. WEI, N. Specific oxygen uptake rate variation during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. **Biotechnology Progress**, 19:1439-1443, 2003.

RÜEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; ALMEIDA, W. F. **O impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde e a sociedade**. 2.ed. São Paulo: Ed. Ícone, p. 93, 1991.

SALAMA, H. S.; ABD EL-GHANY, N. M.; SAKER, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, p. 101-109, 2015.

SALLET, L.A.P. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)**. Tese doutorado, Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Molecular, 92 f., 2013.

SANTOS, F. P.; LOPES, J.; VILAS-BÔAS, G. T.; ZEQUI, J. A. C. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 122, p. 64-70, 2012.

SARASWATHY, N.; KUMAR, P. A. Protein engineering of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 178-188, 2004.

SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, p. 273-281, 2017.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; FERRÉ, J.; Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins to *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

SILVEIRA, M. M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructos oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 442-445, 2001.

SINDIVEG –Sindicato Nacional Das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Dados de produção e consumo de agrotóxicos. Disponível em:<<http://sindiveg.org.br/> >. Acesso em: 15 de julho de 2018.

SIKDAR, D. P.; MAJUMBAR, M. K.; MAJUMBAR, S. K. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenses*. **Biotechnology Letters**, v.13, n. 7, p. 511-517, 1991.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINHEIRO, V. C. S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANZYK, R. A.; TADEI, W. P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 1-6, 2015.

TAILOR, R. J. ; TIPPET, J. ; GIBB, G. ; PELLIS, S. ; PIKE, D. ; JORDAN, L. ; ELY, S. Identification and Characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211-1217. 1992.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. D. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

VILAS-BOAS, G.; ALVAREZ, R. C.; SANTOS, C. A; VILAS-BOAS, L. A. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, n.1, p. 1-10, 2012.

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 Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 747-749. 1999.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: CAROZZI, N.B.; KOZIEL, M. (Ed.). **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylors and Francis, 1997. p. 109-121.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H.; Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: **Entomopathogenic bacteria**. Amsterdam: Kluwer Academic Publications, 2000. p. 81-100.



ZHANG, Q.; HUA, G.; ADANG, M. J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. **Insect Science**, v. 24, p. 714-729, 2016.