

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
Campus Alto Paraopeba
Engenharia de Bioprocessos

**PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO MEIO
ALTERNATIVO: MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SORO DE LEITE**

Tamara Lopes Silva

Orientadora: Sandra de Cassia Dias

Ouro Branco
Julho/2017

**PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO MEIO
ALTERNATIVO: MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SORO DE LEITE**

Tamara Lopes Silva

Trabalho de conclusão de curso apresentado
em cumprimento as exigências do curso de
Bacharelado de Engenharia de
Bioprocessos da Universidade Federal de
São João Del Rei.

Orientadora: Sandra de Cassia Dias

Ouro Branco
Julho/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
Campus Alto Paraopeba
Engenharia de Bioprocessos

**PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA *Bacillus thuringiensis* UTILIZANDO MEIO
ALTERNATIVO: MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SORO DE LEITE**

Tamara Lopes Silva

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra De Cassia Dias – UFSJ

Orientadora

Prof. Dr. Ênio Nazaré de Oliveira
Júnior – UFSJ
Banca Examinadora

Paula Resende Vieira – UFSJ
Banca Examinadora

Ouro Branco, 10/07/2017

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1.	Objetivo geral.....	3
2.2.	Objetivos específicos.....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1.	Bioinseticidas.....	4
3.2.	Micro-organismo: <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
3.2.1.	Toxinas.....	12
3.2.2.	Proteínas Cry.....	12
3.2.3.	Proteínas Cyt.....	13
3.2.4.	Sinergismo entre a proteína Cry e a Cyt.....	13
3.3.	Meios alternativos.....	14
3.3.1.	Soro de leite.....	14
3.3.2.	Melaço de cana-de-açúcar.....	15
3.4.	Planejamento fatorial.....	17
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1.	Isolamento da bactéria.....	19
4.2.	Pré-inoculo.....	19
4.3.	Fermentação.....	20
4.4.	Análises.....	20
4.4.1.	Densidade óptica: Quantificação celular.....	20
4.4.2.	Método de Lowry: Determinação de proteínas totais.....	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
5.1.	Biomassa.....	21
5.2.	Dosagem de proteína total.....	24
6.	CONCLUSÕES.....	28
7.	PERPESCTIVAS.....	29
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema demonstrativo das etapas da esporulação bactérias do gênero <i>Bacillus</i> (PEARSON, 2010).....	5
Figura 02 - Micrografia eletrônica de um endósporo bacteriano. Compartimentos e moléculas presentes no endósporo (TODAR, 2012)	6
Figura 03 - Micrografia eletrônica de varredura (SEM) da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> transformando-se em esporos. Ampliação do microscópio 10 000x. (SCIMAT, 2016)	7
Figura 04 - Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-criatis da estirpe de <i>Bacillus thuringiensis</i> S234, aumentado de 20.000x. Cb: cristal bipiramidal, ep: esporo, cc: cristal cuboide (PRAÇA, 2004)	8
Figura 05 – Plano fatorial 2 ² (ELIAS, 2014)	17
Figura 06 – Representação geométrica dos efeitos do planejamento fatorial 2 ² para avaliação do crescimento celular do <i>B. thuringiensis</i> utilizando melaço como fonte de carbono e soro de leite como fonte de nitrogênio.....	21
Figura 07 - Representação geométrica dos efeitos do planejamento fatorial 2 ² para avaliação da concentração de proteínas do <i>B. thuringiensis</i> utilizando melaço como fonte de carbono e soro de leite como fonte de nitrogênio.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Bioinseticidas a base de <i>Bacillus Thuringiensis</i> fabricados ou registrados no Brasil (ADAPAR, 2017., CHEMICAL, 2017., EMBRAPA, 2010)	13
Tabela 02: Composição dos nutrientes do soro de leite (COSTA, <i>et al</i> , 2012., MIZUBUTI, 1994)	16
Tabela 03: Composição dos nutrientes do melaço de cana-de-açúcar (ALIMENTAÇÃO SAUDAVEL, 2017)	18
Tabela 04: Planejamento fatorial para produção do bioinseticida <i>Baccillus thuringiensis</i> cultivado em fonte de carbono e nitrogênio alternativas.	21
Tabela 05: Resultados das absorbâncias obtidas após o tempo de fermentação de 72 horas a 660 nm, dos diferentes experimentos do planejamento experimental e do meio padrão.....	23
Tabela 06: Concentração de proteína total dos cultivos utilizando o planejamento fatorial 2 ² e do cultivo utilizando o meio padrão descrito na literatura.....	26

PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA *BACILLUS THURINGIENESIS* UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO

RESUMO

A utilização demasiada de inseticidas químicos em lavouras e o despejo inadequado de resíduos industriais em corpos de água acarretam poluição ambiental e problemas para a saúde humana. Como possibilidade de minimizar tais problemas, este estudo utilizou dois resíduos agroindustriais para produção do *Bacillus thuringiensis*. A bactéria foi isolada do produto comercial Dimy Pel, que contém esporos e células do *Bacillus thuringiensis*, linhagem HD-1. O meio alternativo foi constituído por fonte de carbono, fonte de nitrogênio, elementos traço, melaço de cana de açúcar, soro de leite, carbonato de cálcio (CaCO_3 0,2% m/v) e sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05% m/v), respectivamente. A concentração da fonte de carbono e nitrogênio alternativa foi avaliada utilizando o planejamento fatorial 2^2 . Diferentes proporções de melaço de cana-de-açúcar 0,3 e 0,5% (m/v), soro de leite 0,5% e 2% (m/v) foram utilizadas. A produção de biomassa foi avaliada utilizando a absorbância a 660 nm, proteína total foi dosada utilizando o método de Lowry. O *Bacillus thuringiensis* cresceu nos quatro diferentes meios de cultivo. A maior produção de biomassa foi observada no meio que utilizou 0,3% de melaço de cana de açúcar e 0,5% de soro de leite, a densidade ótica deste meio foi 13,35% maior que a densidade ótica do meio padrão. Para a densidade ótica, a alta concentração de melaço de cana de açúcar e soro de leite não favoreceu o crescimento celular. Desta forma novas pesquisas devem ser desenvolvidas utilizando estes resíduos para avaliar a produção de esporos e de endotoxinas utilizando esta composição de meio alternativo.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, melaço de cana açúcar, soro de leite, esporos, cristais, bioinseticidas, sustentabilidade.

1. INTRODUÇÃO

Nesta era contemporânea o setor industrial possui expressiva participação econômica, portanto o incentivo e a necessidade de alta produção das indústrias tornam-se necessária e inevitável. Diversas indústrias utilizam diferentes sistemas de processos para utilização correta da matéria-prima com a finalidade de obter seu produto final de qualidade. Algumas etapas desses processos geram resíduos que muitas vezes não são reaproveitados ou são descartados de maneira incorreta, acarretando poluição ambiental que concomitantemente levam a outros problemas que afetam a população de maneira direta ou indireta. Visto que com o passar dos anos o problema foi-se acumulando e muitos especialistas propuseram estudos com a finalidade de reutilização desses resíduos devido as suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Tem-se como exemplos o soro de leite e o melaço de cana-açúcar, ambos são subprodutos de indústrias alimentícias que possuem alto valor nutricional e são utilizados em outros processos industriais. No presente trabalho os mesmos foram utilizados como fonte de carbono (melaço de cana-de-açúcar) e fonte de nitrogênio (soro de leite) para o meio de cultivo do *Bacillus thuringiensis*. O soro também pode ser utilizado como fonte de carbono por possuir lactose em sua composição. (PRÓPRIA AUTORA).

Vale ressaltar que o aumento da produção agrícola para atender à crescente demanda por alimentos, está relacionado ao uso intenso de insumos para reduzir as perdas, causadas por fatores bióticos e abióticos, durante o processo produtivo. Estes insumos tem grande impacto no ecossistema. A intensificação dos estudos ecológicos e ênfase em novos métodos de controle de pragas levaram à concepção do Manejo Integrado de Pragas (MIP), que visa o uso racional dos agrotóxicos. Estes devem ser utilizados, somente quando necessário e na quantidade recomendada. O controle biológico se destaca pela sua eficiência, pelo reduzido risco ao meio ambiente e à saúde humana (BREWER & GOODELL, 2012; KOGAN, 1988; PANIZZI, 2013)

Dos agentes de controle biológico disponíveis para o MIP a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é utilizada para o controle lepidópteros e coleópteros, na forma de bioinseticida ou como plantas transformadas expressando toxinas desta bactéria (BRAVO *et al.*, 2011; CAB INTERNACIONAL CENTRE, 2010; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000; JAMES, 2014). Esta bactéria está presente em solos, ambientes aquáticos, superfície e interior de plantas, restos de vegetais, insetos e

pequenos mamíferos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (POLANCZYK, 2014). Devido à sua adaptação a diferentes habitats, *B. thuringiensis* produz uma grande gama de substâncias que podem ser utilizadas para diversos fins, como por exemplo, controle de doenças fúngicas em plantas (AKRAM *et al.*, 2013), biorremediação e em estudos visando tratar células cancerígenas humanas (POORNIMA *et al.*, 2010). Desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de 300 produtos à base de *Bt* são responsáveis por 53% do mercado mundial de bioinseticidas, gerando um faturamento anual de 210 milhões de dólares (CAB INTERNACIONAL CENTRE, 2010).

A eficácia e especificidade das cepas de *Bt* e suas toxinas no controle de insetos e pragas, favoreceu a formulação de bioinseticidas à base deste patógeno. (PRÓPRIA AUTORA).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar e avaliar a produção das toxinas Cry e Cyt produzidas a partir da esporulação e do crescimento celular do *Bacillus thuringiensis*, utilizando melaço como fonte de carbono e soro de leite como fonte de nitrogênio no meio de cultivo.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a produção de biomassa de *Bacillus thuringiensis* no meio de cultura contendo melaço de cana de açúcar e soro de leite e com o meio padrão descrito na literatura;

Quantificar a concentração de proteínas/toxinas produzidas no meio alternativo contendo diferentes proporções de melaço de cana de açúcar e soro de leite no meio padrão.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bioinseticidas

Desde tempos remotos muitos agricultores optam pelo uso excessivo de inseticidas químicos na agricultura com o intuito de erradicar pragas e consequentemente aumentar a produtividade. Com o decorrer do tempo tal atividade se torna um problema, acarretando: empobrecimento do solo, poluição de fontes de água próximas, resistência das pragas presentes nas plantações, erradicação de micro-organismos necessários para o controle biológico do ambiente, além de problemas de saúde em humanos e organismos vivos que consomem os alimentos obtidos das lavouras submetidos aos inseticidas. A fim de minimizar esses problemas, a substituição de inseticidas por bioinseticidas se faz necessária (BUENO, *et al*, 2017). Bioinseticidas são menos agressivos ao ambiente, possuem alta capacidade de dispersão e multiplicação na região onde foi aplicado (JÚNIO, *et al.*, 2010). Entretanto, possuem elevados custos de produção, que pode ser solucionado através da otimização dos processos fermentativos. (DIAS, 1992).

O uso de microrganismos entomopatogênicos para obtenção do equilíbrio ou erradicação das pragas como controle microbiano é um ramo do controle biológico. A especificidade e seletividade desses micro-organismos, a facilidade de multiplicação/dispersão dos mesmos, possibilidade de produção em meios artificiais, menor toxicidade e poluição ambiental, são aspectos que contrapõem ao controle químico convencional dando ao controle biológico como método viável para o início da consecução de uma agricultura sustentável (PALLINI, *et al*, 2009).

As bactérias neste caso possuem forma de bastonetes, são esporulantes e penetram nos insetos por via oral (BUENO, *et al*, 2017), seus esporos são desenvolvidos pelo fenômeno de esporulação ou esporulogênese, ocorre quando as condições do meio ficam inadequadas, os nutrientes essenciais para sobrevivência e multiplicação celular vão tornando-se escassos. Para garantir a sobrevivência celular o processo ocorre durante a reprodução assexuada especificamente na fase de declínio/morte: (1) forma-se um septo separando o DNA recém-replicado e uma porção de citoplasma, (2) a membrana plasmática começa a circundar o DNA, o citoplasma e a membrana isolados na etapa anterior, (3) há a capa do esporo previamente formada (4) a

camada de peptideoglicano se forma entre as membranas (5) forma-se o revestimento do esporo (6) o endósporo é então expelido da célula. Tal mecanismo é exemplificado na Figura 01, (PEARSON, 2010).

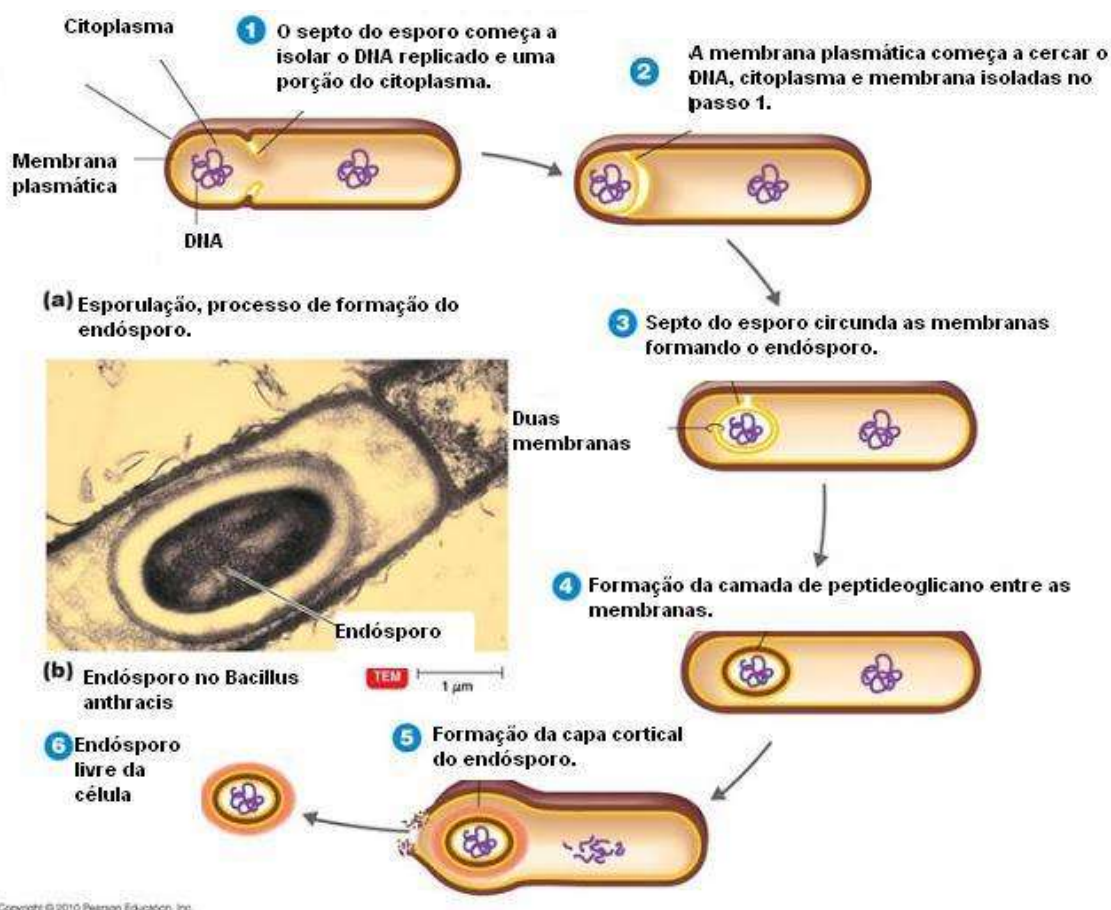


Figura 01 - Esquema demonstrativo das etapas da esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* – Fonte: PEARSON, 2010.

Em condições inóspitas as células esporuladas permanecem no estado de latência, quando submetidas a condições favoráveis, o esporo é reativado, dando continuidade a divisão celular (PRÓPRIA AUTORA).

As bactérias produzem um único endósporo internamente. O esporo é envolvido externamente por um revestimento delgado conhecido como exósporos, que recobre a capa do esporo, esta capa pode conter enzimas na germinação e garante a resistência do endósporo a moléculas tóxicas e agentes físicos. O córtex está localizado internamente à capa do esporo, é formado por camadas de peptideoglicano que garante a rigidez estrutural do endósporo. Abaixo do córtex tem-se o núcleo do esporo, constituído por

estruturas celulares normais como parede celular, citoplasma, DNA e ribossomos, mas é metabolicamente inativo (LAPORTA, 2007). Dentro do núcleo do endósporo há cerca de 15% de dipicolinato de cálcio, cuja função é a estabilização do DNA da bactéria, além de garantir a resistência do esporo ao calor e agentes oxidantes, todos esses compartimentos e moléculas são demonstrados na Figura 02. (PRESCOTT, 1993).

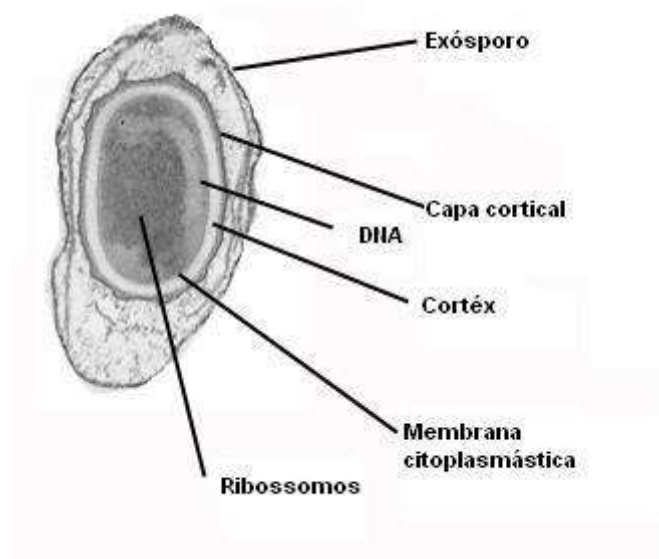


Figura 02 - Micrografia eletrônica de um endósporo bacteriano. Compartimentos e moléculas presentes no endósporo. Fonte: TODAR, 2012.

As bactérias entomopatogênicas esporulantes apresentam alto potencial comercial, dentre estas o *Bacillus thuringiensis* (var. *kurstaki*, var. *israelenses* e var. *tenebrionis*), *Bacillus sphaericus*, *Bacillus larvea*, *B.alvei*, *Serratia marcescens* e *S. entomophila* (BUENO, et al, 2017).

O *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90%–95% do mercado mundial de bioinseticidas (VALADARES, et al., 2007) apresenta ampla distribuição, produz diferentes proteínas tóxicas específicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (PRAÇA, et al., 2004). O que caracteriza a diferença entre as subespécies presentes de *Bacillus thuringiensis* é a presença de determinados genes que produzem proteínas-toxinas específicas a uma quantidade de ordem de insetos (PRAÇA, et al.,2003).

3.2 Micro-organismo: *Bacillus thuringiensis*

O primeiro isolamento da bactéria *Bacillus thuringiensis* foi realizado a partir de larvas mortas de bicho da seda (*Bombyx mori* Linnaeus) e descrito em 1901 pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwata. Sua nomenclatura atual data de 1911, quando Ernst Berliner isolou um bacilo a partir de larvas mortas da traça da farinha (*Anagasta kuehniella* Zeller) e o nomeou de *Bacillus thuringiensis* em homenagem a província de Thuringia, localizada na Alemanha. Em 1940, iniciou-se o uso do *B.thuringiensis* como controle de insetos e pragas na agricultura, mas, somente 18 anos depois, na França houve o aparecimento da primeira formulação de inseticida biológico à base da bactéria em questão. (BALBINNOTE, 2012). Contudo, o *Bacillus* além de ser utilizado no controle biológico de pragas agrícolas e silvícolas também é utilizado na engenharia genética de plantas, a partir da manipulação dos genes que codificam as proteínas entomopatogênicas de *B. thuringiensis* para conferir resistência a pragas. As primeiras plantas transgênicas que expressaram toxinas de Bt foram plantas de tabaco e tomate. Na Figura 03 é mostrado uma imagem da cultura da cultura de *Bacillus thuringiensis* através da micrografia eletrônica de varredura (SCIMAT, 2016).

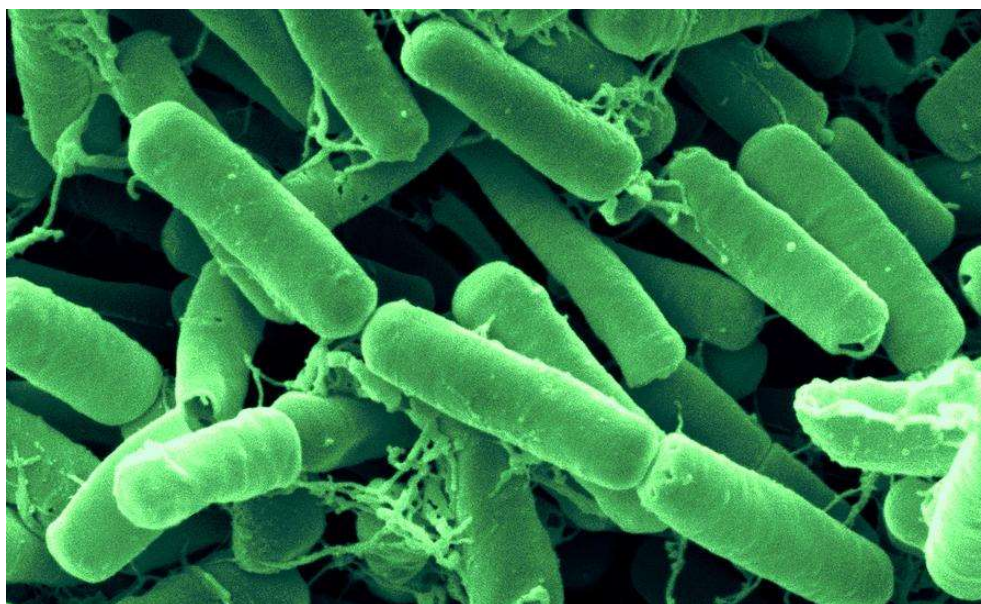


Figura 03 - Micrografia eletrônica de varredura (SEM) da cultura de *Bacillus thuringiensis* transformando-se em esporos. Ampliação do microscópio 10 000x. Fonte: SCIMAT, 2016.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) pertencente ao reino *Eubacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Bacillaceae*, gênero *Bacillus* e espécie *thuringiensis*, são células gram-positivas, apresentam-se morfológicamente em forma de bastonetes medindo 1 a 1,2 μm de largura por 3 a 5 μm de comprimento, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e quimioheterotróficas. Desenvolvem-se em diferentes ambientes: solos argilosos, água, grãos, excretas e cadáveres de insetos (BOBROWSKI, *et al.*, 2003., KAUR, 2015., MENEZES, 2016) e crescem a uma faixa de temperatura de 10-40°C, cuja temperatura ótima para crescimento é de aproximadamente 32°C. O esporo dessa bactéria possui geometria elíptica e cilíndrica, apresentando cristal proteico intracelular, este cristal é a própria toxina como demonstrado na Figura 04. (ANGELO, 2010., MENEZES, 2016).

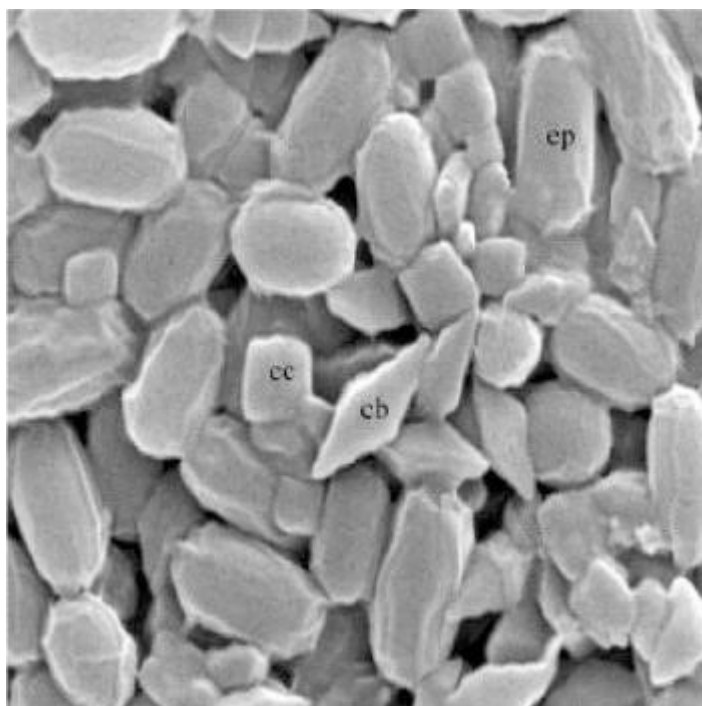


Figura 04 - Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S234, aumentado de 20.000x. Cb: cristal bipiramidal, ep: esporo, cc: cristal cúbico. Fonte: PRAÇA, 2004.

Sua estrutura genômica é composta por cromossomo/plasmídeo circular, contendo de 32-35% bases de bases GC aproximadamente, a totalidade genômica é de 5.2-5.9 megabases. As diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis* possuem uma gama de plasmídeos que variam em número e em tamanho (KAUR, 2015).

Para o crescimento ótimo do *Bacillus thuringiensis* é indispensável que haja fonte de carbono, fonte de nitrogênio, e fonte de minerais, carbonato de cálcio (CaCO_3) e sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Além dos parâmetros físicos, temperatura de 30°C, agitação de 180 rpm segundo ALVES *et al*, 1997.

As fontes de carbono, os açúcares, são essenciais para produção de energia. A molécula orgânica, geralmente a glicose (açúcar) é degradada em compostos mais simples, liberando energia. A glicose é a molécula de preferencia pelos micro-organismos para obtenção de energia, caso a mesma não esteja presente no meio o micro-organismo utiliza de outras vias metabólicas que fazem uso de outros tipos de açúcares mas que no final são degradados até se originar a molécula de glicose dando continuidade ao metabolismo de carboidratos e consequentemente a produção de ATP. O ATP é essencial para sustentar os processos anabólicos do crescimento microbiano (biossíntese de macromoléculas para duplicação dos constituintes celulares durante o crescimento), para manutenção das estruturas e da homeostase celular (regulação do pH do citosol) e para movimentação. (GALLO, 2015). A via pela qual os heterotróficos metabolizam carbono como substrato é importante para se determinar a quantidade de carbono convertido em material celular. Verifica-se que os organismos facultativos incorporam cerca de 10% do carbono do substrato quando metabolizado anaerobicamente, 50-55% com metabolismo completamente aeróbico (JARDINE, 2011).

A fonte de nitrogênio é essencial para síntese de aminoácidos e consequentemente das proteínas. As proteínas são as próprias enzimas que têm a função de catalisar as reações metabólicas microbianas de maneira mais rápida, garantindo a especificidade e sensibilidade. O nitrogênio pode ser suprido a maioria dos organismos industrialmente importantes por meio de amônia ou de seus sais, embora o crescimento seja mais rápido quando se utiliza o próprio nitrogênio orgânico. Os compostos nitrogenados mais utilizados industrialmente são: farelo de soja, farelo de amendoim, farinhas de peixe ou de carne, borras de cerveja, extrato de levedura ou soro de leite (JARDINE, 2011).

As fontes de minerais ditas elementos traços são subdivididas em macronutrientes ou micronutrientes necessários para ideal funcionalmente dos processos enzimáticos, pois são cofatores enzimáticos, na ausência dos mesmos a enzima pode-se tornar inativa cessando as reações de produção de ATP, dentre outras reações necessárias para

metabolismo do micro-organismo e contaminante sua multiplicação celular. Fósforo e magnésio estão relacionados com todas as reações de transferência de energia envolvendo ATP e síntese de ácidos nucleicos. Também são indispensáveis para o bom desenvolvimento da cultura: o cálcio, potássio, enxofre e sódio, denominados macronutrientes, assim como os micronutrientes: ferro, cobalto, cobre e zinco (JARDINE, 2011).

De maneira geral as fontes de carbono, nitrogênio e de minerais agem em sinergismo para o funcionamento adequado do metabolismo dos micro-organismos, visto que a fonte de carbono garante que o ATP seja produzido para que as reações metabólicas tenham energia para serem realizadas, essas reações necessitam das proteínas/enzimas para catalisá-las fazendo com que a mesma ocorra de maneira rápida e específica, as enzimas necessitam de seus cofatores que advêm dos elementos traço do meio para que a catalise ocorra de adequadamente (PRÓPRIA AUTORA).

As formulações de bioinseticidas à base *Bacillus thuringiensis* são compostas por esporos e os cristais da bactéria que garantem a toxicidade, apenas nos anos 50 iniciou-se a produção em larga escala. No Brasil, os produtos constituídos de *B. thuringiensis* com ação bioinseticida comercializados são: Agree, Bac-Control PM, Bactur PM, Dipel, Dipel PM, Ecotech Pro e Xentari, cujo principais ativos são as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* utilizadas no controle de lagartas desfolhadoras: *P. xylostella* (traça das crucíferas), *A. gemmatilis* (lagarta da soja) e outras espécies pertencentes da ordem *Lepidoptera: Noctuidae* (PRAÇA, et al, 2007).

No Brasil a Embrapa (Brasília) e a Sumito Chemical do Brasil (São Paulo) produzem ou registraram o inseticida biológico desenvolvido para o controle das larvas de diferentes insetos à base de Bt e são comercializados como Bt-horus SC e Dipel - VectoBac AS, respectivamente (ADAPAR, 2017., CHEMICAL, 2017., EMBRAPA, 2010).

Tabela 01: Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* fabricados ou registrados no Brasil.

Linhagem/Sub-espécie	Culturas alvo	Pragas Alvo	Nome Comercial	Empresa
H-14/Israelensis	-	Mosquito da dengue Larvas dos Borrachudos	Bt-horus SC	Embrapa
HD-1/ Kurstaki	Álamo	Mariposa álamo	*Dipel	Sumito Chemical do Brasil
	Algodão	Curuquere		
	Citrus	Largata das maçãs		
	Eucalipto	Bicho furão		
	Melão	Largata Thyrinteira		
	Repolho	Broca das cucurbitáceas		
	Soja	Largata mede-palmo		
	Tomate	Curuquerê da couve		
	Trigo	Largata da soja		
H-14/Israelensis	-	Mosquito da dengue Larvas dos Borrachudos	VectoBac AS	Sumito Chemical do Brasil

* A Sumitomo Chemical Do Brasil Representações Ltda é o titular do registro do inseticida biológico Dipel, o fabricante e manipulador do produto é a empresa ABBOTT LABORATORIES Chemical & Agricultura Products Division - North Chicago, USA como também a empresa FMC Química do Brasil Ltda – Uberaba, Brasil que realiza a manipulação e formulação do mesmo.

Fonte: ADAPAR, 2017., CHEMICAL, 2017., EMBRAPA, 2010.

O Dipel produto a base de Bt, conhecido e utilizado para manejo de resistência de pragas, é recomendado que seja aplicado no início da infestação, na presença de lagartas/larvas pequenas, caso contrario é necessário a associação a outro produto que ataque o inseto em sua forma adulta, tal procedimento é denominado Manejo Integrado de Pragas (MIP), caso haja reinfestação deve-se repetir o procedimento. O bioinseticida pode controlar mais de 55 espécies de lagartas, relata Valent Biosciences. Os produtos VectoBac AS e Bt-horus SC possuem as mesmas características microbiológicas da formulação e atingem os mesmos insetos alvo. Um estudo realizado pelo Departamento de Zoologia, IB-UNICAMP através de bioensaios demonstrou que a potencia 1.200 UTI (Unidades Tóxicas Internacionais) declarada por ambos não foi obtida, entretanto o Vectobac apresentou maior potência que o Bt-horus SC quando estabelecido uma concentração menor e maior em ppm previamente estabelecida por determinada faixa de tempo (ANDRADE, 2007). Todo inseticida comercializado possui em sua embalagem uma bula (ficha técnica) com detalhamento de sua formulação, instruções de uso e aplicação, dados relativos a proteção humana e ao meio ambiente (ADAPAR, 2017).

3.3.1 Toxinas

Durante a fase de esporulação a Bt produz diversas proteínas com características pesticidas, sendo elas: δ -endotoxinas, proteínas VIP, α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases, mas as δ -endotoxinas possuem fator principal de patogenicidade (ALVES, 2001).

As δ -endotoxinas são subdivididas em proteínas Cry e Cyt conhecidas como toxinas formadoras de poros (TFP), solúveis em água, susceptíveis a modificações conformacionais possibilitando a inserção das mesmas na membrana celular do inseto alvo (BRAVO, 1997). As proteínas Cry associam-se a receptores existentes no intestino médio de insetos, já as proteínas Cyt inserem-se diretamente na membrana do intestino do inseto alvo lisando as suas células, possuem maior capacidade de ação contra os insetos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Os cristais formados na fase de esporulação são constituídos por diferentes proteínas Cry e Cyt, esses cristais são desenvolvidos no segundo estágio de esporulação e assim liberados (ALVES, 2011).

Durante o cultivo do Bt tem-se a fase de crescimento vegetativo e a fase estacionária. Na fase de crescimento há alta disponibilidade de nutrientes, portanto a taxa de crescimento das células é elevada, com a queda de nutrientes no meio inicia-se a fase estacionaria e a reprodução celular é cessada, esta etapa é característica da esporulação e conseqüentemente a expressão dos genes cry e cyt, acumulando seu produto na célula-mãe, na forma de uma inclusão cristalífera, a qual é liberada no meio no final da esporulação juntamente aos esporos. Os cristais no final da esporulação correspondem a 20-30% do peso celular seco (ANGELO, 2010).

3.3.1.1 Proteínas Cry

A massa molecular das toxinas Cry é de 30 a 140 kD, sua estrutura molecular possui duas regiões: uma região amino-terminal onde a toxina está presente e a carboxi-terminal necessária para formação do cristal proteico. São tóxicas especificamente para insetos das ordens lepidoptera, coleóptera, hymenoptera e díptera (LIMA, 2010). As proteínas Cry são ativadas por proteases presentes no intestino do inseto e também dependem das etapas de solubilização (em pH alcalino), processamento, ligação ao receptor, inserção na membrana e citólise que iniciam quando o cristal proteico e o

esporo estão em contato com o inseto. Após o inseto ingerir o cristal proteico o mesmo é dissolvido no intestino médio em pH alcalino. As toxinas solubilizadas são clivadas pelas proteases produzindo fragmentos tóxicos, após ativas o peptídeo amino-terminal e parte do carboxi-terminal são removidos e os fragmentos passam a ser reconhecidos pelos receptores da membrana. A cinética de ligação dessas proteínas depende de quatro diferentes receptores de membrana: aminopeptidase (ANP), caderina (CARD), uma proteína gliconjugada (GCR) e uma fosfatase alcalina (ALP). A associação da proteína a um desses receptores facilita a clivagem ao grupamento amino-terminal resultando na formação de um pré-poro essa estrutura pré-formada interage a outro receptor da célula facilitando a inserção do oligômero na membrana lipídica para formação do poro. A estrutura pré-poro é responsável pelo início da morte celular do inseto-alvo (CORRÊA, 2012).

3.3.1.2 Proteínas Cyt

As proteínas Cyt também denominadas proteínas citolíticas possuem massa molar de 28 kDa, não são homólogas as sequências de aminoácidos das proteínas Cry e são específicas para insetos das ordens lepidópteros, coleópteros e dípteros (CORRÊA, 2012). Ao contrário das proteínas Cry elas não se associam a receptores específicos. Elas interagem diretamente a membrana lipídica dos insetos, formando poros ou promovendo a permeabilização celular semelhante a ação dos detergentes. É ativada através de proteases, proteinases K, gerando um fragmento tóxico de 25 kDa com 249 aminoácidos e então é adicionado na membrana através de canais cátions-seletivos levando a lise celular e consequentemente a morte do inseto-alvo (COSTA, *et al*, 2011).

3.3.1.3 Sinergismo entre a proteína Cry e a Cyt

As proteínas Cyt também agem como receptores adicionais das proteínas Cry, tal fato ocorre pela associação das proteínas Cyt a membrana do inseto-alvo, as regiões que não interagem a membrana são reconhecidas pelas proteínas Cry, possibilitando a conversão de monômeros a polimerização e consequentemente o desenvolvimento dos poros (COSTA, *et al*, 2011).

3.4 Meios alternativos

O Brasil é um dos países que possui sua economia baseada na agricultura, exportando matérias-primas como cana-de-açúcar, soja, frutas e leguminosas. A elevada produção e consumo desses produtos acarretam em grande geração de resíduos industriais e domésticos, que muitas vezes são descartados indevidamente no meio ambiente. Uma das alternativas é a reutilização desses resíduos, como utiliza-los em meio de cultura para produção de microrganismos. São fontes baratas quando comparado ao meio de cultura tradicional e são fontes ricas em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, vitaminas e fosfatos (ANDRADE, 2009).

3.4.1 Soro de leite

O soro de leite é um produto da indústria de laticínios obtido por coagulação do leite e redução do pH, a porção aquosa se separa do coagulo durante a fabricação do queijo ou manufatura da caseína, seu volume consiste em 90% do volume do leite e possui aproximadamente 50% de nutrientes do mesmo. O soro é composto por 0,8 % de proteínas solúveis, 4,5% de lactose, 1% de minerais e vitaminas, 0,1 a 0,8% de ácidos lácticos e nitrogênio não solúvel, Tabela 02 (COSTA, *et al*, 2012., MIZUBUTI, 1994).

Tabela 02: Composição dos nutrientes do soro de leite.

Composição nutricional do soro de leite	
Nutrientes	Proporção (%)
Lactose	4,5
Proteínas solúveis	0,8
Minerais (Cálcio, ferro e magnésio)	1
Vitaminas	1
Ácidos lácticos e nitrogênio não solúvel	0,1-0,8

Fonte: COSTA, *et al*, 2012., MIZUBUTI, 1994.

O grande consumo de queijo pela população incentiva a produção do mesmo, gera um grande volume de soro e que não é reutilizado sendo descartado de maneira inadequada, provocando impactos ambientais consideráveis devido a alta demanda biológica de oxigênio, DBO. Na produção de queijos, o soro é descartado, pois a conservação líquida é praticamente impossível para as queijarias, tendo em vista que o soro sofre alterações em sua composição. Em muitos casos, o soro líquido, é jogado diretamente em rios pela pouca oportunidade atual de uso desta matéria prima, poluindo assim o meio ambiente. Cerca de 50.000 litros de soro lançados como efluentes

equivalem a um esgoto de uma cidade com 25.000 habitantes. A DBO de um litro de soro é de aproximadamente 45g/l e necessita que o oxigênio esteja dissolvido em 4.500 litros de água para recuperação do meio, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas, ele é aproximadamente cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico (COSTA 2014., MIZUBUTI,1994). O soro, o leite e o leite ácido, pelos seus valores nutritivos e pelas suas elevadas cargas orgânicas não devem ser misturados aos demais efluentes da indústria, devem ser recolhidos e conduzidos separadamente, de modo a viabilizar o seu aproveitamento na fabricação de outros produtos lácteos ou para utilização direta na alimentação de animais (SILVA, 2011). A fim de oferecer alternativas para mitigação desse tipo de poluição e devido ao seu alto valor nutricional, novas tecnologias e produtos vêm sendo desenvolvidos como opções para sua reutilização, uma vez que o concentrado de proteínas do soro (CPL), é uma fonte excelente de proteínas, obtidas a baixo custo, cuja não utilização e consequente rejeição não só se traduz em prejuízo econômico, como até conduz a graves problemas ambientais.

Como aditivo ou complemento alimentar, pode ser utilizado em leite reconstituído, dietas infantis, bebidas, carnes processadas (hambúrgueres) e, devido às suas propriedades de gelificação, pode ser utilizado, na substituição da clara do ovo, uma vez que apresenta uma firmeza três vezes superior ao ovo (COSTA, *et al*, 2012., SILVA 2011). No presente estudo foi utilizado como fonte de nitrogênio do meio para cultivo da Bt devido a sua alta quantidade de proteínas.

3.4.2 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço é resultante da etapa de centrifugação, no processo de fabricação de açúcar, é constituído principalmente de açúcares como frutose, glicose e sacarose que não foi cristalizada na produção de açúcar. O melaço em questão é derivado da cana-de-açúcar, mas pode ser obtido de outras fontes de tubérculos como a beterraba. É utilizado na fermentação para produção de álcool, em especial o etanol, como matéria-prima para fabricar cachaça, rum, fermentos biológicos e produção de rações animais (CAVALCANTI, 2011., BARROS, 2005., REBELATO, 2013).

O processamento industrial da cana de açúcar apresenta uma cadeia produtiva em que várias de suas etapas, se não gerenciadas adequadamente, podem provocar

impactos ambientais indesejados principalmente associados ao solo e à água. Os resíduos gerados no processamento industrial da cana de açúcar o melaço ocupa quarto lugar no impacto ambiental com potencial de 8,75%. O melaço não constitui propriamente um resíduo, e sim um subproduto, ou seja, o mel final, mais conhecido como melaço, que veio do processo de produção do açúcar, será utilizado para a produção de etanol. Apesar de poder ser utilizado como alimento para animais, o melaço é muito poluente por ser concentrado, com até 85° Brix, portanto com DBO elevada. Haverá problemas ambientais se o melaço chegar ao solo ou às águas. Para cada tonelada de cana produz de 40 a 60kg de melaço (REBELATO, 2013).

O melaço é utilizado na alimentação desde o tempo do Brasil colonial. Atualmente é empregado, principalmente no Brasil, também como suplemento para forragens volumosas para gado de corte, suplemento para alimentação de porcos e cavalos, adubação orgânica, adubo foliar, cicatrizar o pé de batata após chuva de granizo, pulverização do milho, confecção de molde na indústria de fundição, confecção de refratários, revestimento de forno e na massa de tijolo na indústria cerâmica, dar consistência à porcelana, fabricação de briquete em mineração, dar consistência ao papelão e à casquinha de sorvete, em pneus, em velas para filtro de água, produção de proteína, levedura para panificação, antibiótico, umectante para fumos usados em cachimbos de água, como o Narguilé (CAVALCANTI, 2011., BARROS, 2005).

Tabela 03: Composição dos nutrientes do melaço de cana-de-açúcar.

Composição nutricional do melaço de cana de açúcar	
Nutrientes	Proporção (%)
Manganêsio	18
Cobre	14
Ferro	13,3
Cálcio	11,8
Potássio	9,7
Magnêsio	7,3
Vitamina B6 (piridoxina)	5,0
Selênio	3,5
Glicose	14

Fonte: ALIMENTAÇÃO SAUDAVEL, 2017.

É um bom suplemento alimentar, como fonte de carboidratos e ferro e no combate à depleção proteica e aos baixos teores de hemoglobina (BARROS, 2005).

3.5 Planejamento Fatorial

A otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável, o que apresenta desvantagens como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação da interferência que uma variável pode ter em relação a outra, estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados. Dentre os tipos de planejamento experimental existentes os sistemas de planejamento fatorial são mais comumente utilizados para área de pesquisa, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais. (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005, CUNICO *et al.*, 2008).

Em um experimento 2^2 fatorial com fatores A e B, cada um com dois níveis: alto e baixo, o qual pode ser interpretado através da Figura 05 - um quadrado onde cada vértice representa uma combinação de tratamento (ELIAS, 2014., CUNICO *et al.*, 2008).

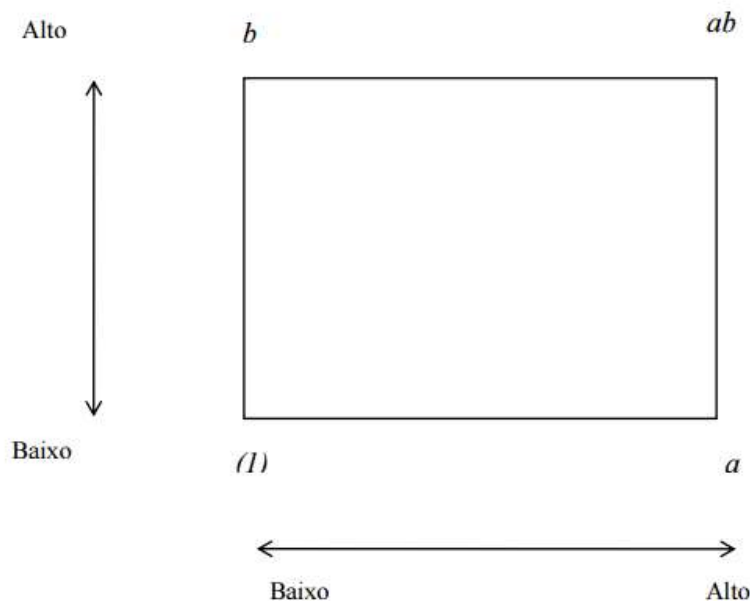


Figura 05 – Plano fatorial 2^2 . Fonte: ELIAS, 2014.

O nível alto de A com o nível baixo de B é representado por a, o nível baixo de A com o nível alto de B é representado por b, quando A e B estão no nível alto, temos ab, e os dois fatores no nível baixo, temos (1), Figura 05. Essa notação representa o total

de cada combinação de tratamento, a partir dessa notação, é calculado as interações entre as variáveis e seus efeitos (ELIAS, 2014., CUNICO *et al*, 2008).

$$A = \frac{1}{2n} (ab + a - b - 1) \text{ Equação 01}$$

$$B = \frac{1}{2n} (ab + b - a - 1) \text{ Equação 02}$$

$$AB = \frac{1}{2n} (ab + 1 - a - b) \text{ Equação 03}$$

O efeito de A é a média entre os efeitos de A no nível mais baixo e mais alto de B. O efeito de B é calculado de maneira análoga. O efeito da interação AB é a média da diferença do efeito de A no nível mais baixo e mais alto de B, mas também, pode ser definido como a média da diferença entre o efeito de B no nível mais alto e mais baixo de A (ELIAS, 2014).

Há pacotes estatísticos capazes de realizar todos os cálculos para um experimento 2^k fatorial, o mesmo pode ser realizado manualmente. Para determinar as somas de quadrados de A, B e AB, usamos os contrastes, também chamados de efeito total. O contraste de A, usado para estimação de A exemplificado pela equação 04 abaixo (ELIAS, 2014).

$$\text{Contraste}_A = ab + a - b - (1) \text{ Equação 04}$$

A soma de quadrados é o quadrado do contraste dividido pelo número total de observações (ELIAS, 2014), como demonstrado pelas equações 5 a 7.

$$SS_A = \frac{(ab+a-b-1)^2}{4n} \text{ Equação 05}$$

$$SS_B = \frac{[ab+b-a-1]^2}{4n} \text{ Equação 06}$$

$$SS_{AB} = \frac{[ab+1-a-b]^2}{4n} \text{ Equação 07}$$

Os contrastes para os efeitos A, B e AB são ortogonais. Consequentemente, o experimento fatorial 2^k é ortogonal. Um experimento fatorial pode facilmente ser expresso por meio de um modelo de regressão. Desta forma, temos o modelo (ELIAS, 2014).

$$y = \beta_o + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \epsilon \text{ Equação 08}$$

x_1 é uma variável codificada que representa o fator A, x_2 é uma variável codificada que representa o fator B (ELIAS, 2014).

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

O meio de cultivo padrão utilizado para o crescimento do *Bacillus thuringiensis* foi o caldo de nutriente, extrato de levedura acrescido de CaCO_3 0,2% m/v e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05% m/v. O melaço de cana de açúcar e soro de leite foram utilizados para o preparo do meio de cultura alternativo.

Tabela 04: Planejamento fatorial para produção do bioinseticida *Baccillus thuringiensis* cultivado em fonte de carbono e nitrogênio alternativas.

Experimento	Variável 1 Melaço de cana de açúcar		Variável 2 Soro de leite	
	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado
1	-	0,3 % (m/v)	+	2,0 % (m/v)
2	+	0,5 % (m/v)	+	2,0 % (m/v)
3	-	0,3 % (m/v)	-	0,5 % (m/v)
4	+	0,5 % (m/v)	-	0,5 % (m/v)

Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2017.

4.1 Isolamento da bactéria

A bactéria foi isolada do produto comercial Dimy Pel contendo esporos e células do *Bacillus thuringiensis*, linhagem HD-1 de esporos viáveis, caulim e dióxido de silício. Em um erlenmeyer 250 ml contendo 60 ml meio padrão nutriente adicionou-se 1 sachê de 5 gramas do produto. A seguir, a suspensão foi incubada a 30°C, 100 rpm por 12 horas. Após as 12 horas, retirou-se 100 µl do meio e transferiu-se para placa de petri contendo meio ágar nutriente, as células e os esporos foram semeados de maneira homogênea. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas.

4.2 Pré-inoculo

As células foram removidas da placa de Petri utilizando solução salina tamponada. Quinhentos microlitro de suspensão contendo células e esporos foram transferidos para erlenmeyer contendo 25 mL do meio de cultura. A seguir os frascos

foram incubados a 30°C, 180 rpm durante 20 horas. Os meios de cultura utilizados nesta etapa foram o meio padrão e os 4 meios apresentados na Tabela 05.

4.4 Fermentação

Cinco mL do pré-inóculo foram transferidos para erlenmeyers contendo 45 ml do meio de cultivo. O meio de cultivo utilizado para a produção do *Bacillus thuringiensis* foram os descritos na Tabela 05, e o meio padrão. Os frascos foram incubados a 30°C, 180 rpm durante 72 horas. Após 72 horas, amostras foram retiradas para avaliação do crescimento da bactéria.

4.5 Análises

4.5.1 Densidade óptica: Quantificação celular

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana possibilita estimar a concentração celular do meio. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm. A leitura foi realizada antes de inocular os microrganismos em seus respectivos meios de cultura para determinar a densidade óptica inicial (D_i) e após 72 horas de cultivo para determinar a densidade óptica final (D_f).

4.5.2 Método de Lowry: Determinação de proteínas totais

A dosagem de proteína total foi realizada utilizando o método de Lowry, 250 µl de amostra foram adicionados 1250 µl do reagente E (NaOH 0,2 mol/l, Na₂CO₃ 4% m/v, CuSO₄ 1% m/v, Na e K 2% m/v), e incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, 250 µl do reagente de Folin- Ciocalteu foram adicionados, a mistura foi incubada durante 20 minutos ao abrigo da luz. O reagente Folin-Ciocalteu sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm, portanto as amostras foram lidas no espectrofotômetro no comprimento de 750 nm (ZAIA *et al*, 1998).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Biomassa

O crescimento do *B. thuringiensis*, nas diferentes condições dos meios de cultura, foi avaliado a partir das análises da densidade óptica, Tabela 05.

Tabela 05: Resultados das absorvâncias obtidas após o tempo de fermentação de 72 horas a 660 nm, dos diferentes experimentos do planejamento experimental e do meio padrão.

Experimento	Variável 1 Melaço de cana de açúcar		Variável 2 Soro de leite		Interação	Resposta (OD _{660nm})
	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado		
1	-	0,3 % (m/v)	+	2,0 % (m/v)	-	1,740
2	+	0,5 % (m/v)	+	2,0 % (m/v)	+	0,867
3	-	0,3 % (m/v)	-	0,5 % (m/v)	+	1,033
4	+	0,5 % (m/v)	-	0,5 % (m/v)	-	1,595
Meio padrão						1,535

Efeitos principais: Melaço de cana de açúcar: $[(-1,740+0,867-1,033+1,595)/2] = -0,155$

Soro de leite: $[(+1,740+0,867-1,033-1,595)/2] = -0,0105$

Efeitos de segunda ordem: Melaço x Soro de leite: $[(-1,740+0,867+1,033-1,595)/2] = -0,7175$

Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2017.

Em todos os experimentos houve produção de biomassa do *B. thuringiensis*. As melhores condições para a produção de biomassa foram o melaço de cana de açúcar (0,3% m/v) e soro de leite (2,0% m/v) (experimento 1), seguido do experimento 4 (melaço de cana de açúcar (0,5% m/v) e soro de leite (0,5% m/v). A produção de biomassa do experimento 1 foi aproximadamente 13% superior a produção de biomassa obtida utilizando o meio padrão, descrito na literatura.

Para uma melhor avaliação dos resultados da densidade óptica dos diferentes experimentos utilizando o planejamento fatorial 2² foi construído a representação geométrica dos efeitos, Figura 06.

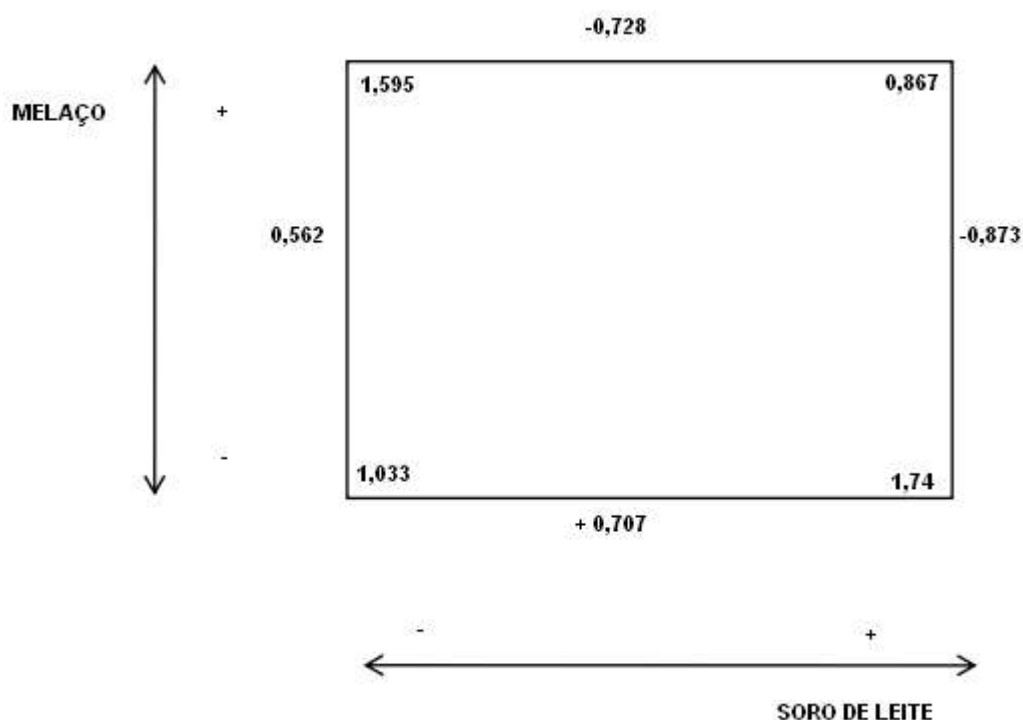


Figura 06 – Representação geométrica dos efeitos do planejamento fatorial 2^2 para avaliação do crescimento celular do *B. thuringiensis* utilizando melaço como fonte de carbono e soro de leite como fonte de nitrogênio.

Analisando a Tabela 06 e a Figura 06, a diferença entre os ensaios 1 e 2 é a concentração de melaço (0,3% e 0,5%, respectivamente). Desta forma a diferença observada na resposta $(+0,867 - 1,740 = -0,873)$ indicou que a densidade ótica diminuiu 0,873 quando a concentração de melaço muda do nível inferior (-) para o nível superior (+), mantendo o soro de leite no nível superior (+). Análise semelhante pode ser feita quando o soro de leite foi mantido no nível inferior (-) ensaios 3 e 4. Nesta análise, a alteração da concentração de melaço de cana de açúcar utilizado (nível +/- nível -) aumentou 0,562 a densidade ótica do cultivo $(+1,595 - 1,033)$. O Efeito global apresentado pela variável concentração de melaço de cana de açúcar foi -0,155 $[(+0,562 - 0,873)/2]$.

Cálculos similares podem ser obtidos para a variável concentração de soro de leite. Os experimentos 1 e 3 o melaço de cana de açúcar foi utilizado na concentração de 0,3% (nível -), o soro de leite foi utilizado na concentração de 2,0% no ensaio 1 e 0,5% no ensaio 3. Nestas condições houve um aumento na densidade ótica de 0,707 $(+1,74 - 1,033)$, o aumento do soro de leite favoreceu a produção de células. A mesma análise

pode ser feita para os ensaios 2 e 4 que utilizaram o melaço na concentração de 0,5% variando a concentração de soro de leite de 2,0% para 0,5%, respectivamente. Neste caso foi observada uma diminuição de 0,728 na densidade ótica (+0,867-1,595). O efeito global apresentado pela variável soro de leite foi +0,012 [(+0,704 -0,728)/2].

Para otimizar a produção de biomassa do *B. thuringiensis* a melhor condição seria melaço de cana de açúcar no nível inferior e soro de leite no nível superior, experimento 1.

O efeito de segunda ordem (-0,717) indica que a associação das variáveis nos mesmos níveis superiores não foi favorável.

CORINA *et al* (2017) utilizaram 6 meios de cultura alternativos para produção do *B. thuringiensis*. Todos os meios continham arroz parboilizado. O meio 1 foi adicionado chorume, o meio 2 utilizou além do chorume glicose de milho e farinha de soja, o meio 3 foi adicionado de chorume, glicose de milho e farinha de soja e sais (MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄ e FeSO₄), o meio 4 utilizou o meio de cultura LB + sais, e o meio 5, glicose de milho, farinha de soja e sais. A densidade óptica para os mesmos também apresentaram variações da produção da massa celular, entretanto, todos apresentaram uma mortalidade contra a principal praga do milho *Spodoptera frugiperda* pertencente à ordem Lepidoptera e a família Noctuidae. O meio 4 apresentou a maior concentração de biomassa.

Os estudos de ARCAS *et al* (1984), IÇGEN (2002), OSKAN *et al.* (2003) e ZOUARI *et al* (1999) indicam que o uso de nitrogênio inorgânico não é aconselhável para o cultivo de *B. thuringiensis*, pois há diminuição de crescimento, esporulação e biossíntese, em relação aos meios contendo tanto nitrogênio orgânico quanto inorgânico. Dentre as fontes de nitrogênio apresentadas por estes autores, os, fosfato de amônia monobásico e dibásico foram os mais promissores. O sulfato de amônia aumentou a esporulação e muitas vezes a produção de toxinas. Entre as fontes orgânicas de nitrogênio, o extrato de levedura é bastante utilizado no cultivo de *B. thuringiensis*, porém peptona e derivados de soja apresentam resultados satisfatórios. Como fontes alternativas, vêm se destacando farinhas derivadas de proteína animal (farinha de peixe

e de crisálida) e alguns cereais (cevada e trigo) (VORA, 1999., IÇGEN, 2002., MORRIS, 1997).

5.2. Dosagem de proteína total

O sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem de proteína total. Tal procedimento foi feito para estimar a concentração de proteínas extracelulares. As proteínas Cyt e Cry A equação da reta (equação 10) foi obtida através da curva padrão utilizando a BSA (proteína albumina do soro bovino). A concentração de proteína total foi obtida a partir desta curva, utilizando a equação 10.

$$y = 0,9771x + 0,0487; r^2 = 0,9838 \quad \text{Equação 10}$$

Tabela 06: Concentração de proteína total dos cultivos utilizando o planejamento fatorial 2^2 e do cultivo utilizando o meio padrão descrito na literatura.

Experimento	Variável 1 Melaço de cana de açúcar		Variável 2 Soro de leite		Interação	Concentração de proteínas (mg/l)
	Codificado	Decodificado	Codificado	Decodificado		
1	-	0,3 % (m/v)	+	2,0 % (m/v)	-	1,074
2	+	0,5 % (m/v)	+	2,0 % (m/v)	+	0,908
3	-	0,3 % (m/v)	-	0,5 % (m/v)	+	1,774
4	+	0,5 % (m/v)	-	0,5 % (m/v)	-	0,884
Meio padrão						0,904

Efeitos principais: Melaço de cana de açúcar: $[(-1,074+0,908-1,774+0,884)/2] = -0,528$

Soro de leite: $[(+1,074+0,908-1,774-0,884)/2] = -0,338$

Efeitos de segunda ordem: Melaço x Soro de leite: $[(-1,074+0,908-0,88+1,77)/2] = -0,362$

Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2017.

A maior concentração de proteína total foi observada no experimento 3, (1,774mg/l). Esta condição utilizou menor concentração de melaço de cana de açúcar e soro de leite, 0,3% e 0,5%, respectivamente. A menor concentração de proteína total foi observada no experimento 4, o qual utilizou maior concentração de melaço de cana de açúcar (0,5%) e menor concentração de soro de leite (0,5%).

Os valores estimados de concentração de proteínas para as diferentes proporções de fonte de carbono e nitrogênio das condições expostas apresentaram-se favoráveis de disposição decrescente para o experimento 3, 1,77, experimento 1, 1,074, experimento 2, 0,908, meio padrão, 0,87 e experimento 4, 0,86. O experimento 3 apresenta os níveis mínimos de fonte de carbono e de nitrogênio, a mesma não apresentando maior quantidade de células no meio mas apresentou maior quantidade proteínas/toxinas

sintetizadas, enquanto que, o experimento 4 com níveis intermediários de fonte de carbono e nitrogênio apresentou boa quantidade de células no meio e o valor estimado da concentração de proteínas baixa.

Para uma melhor avaliação em relação aos valores estimados da concentração de proteínas nos meios em relação aos diferentes níveis de fonte de carbono e fonte de nitrogênio também utilizou-se o planejamento fatorial 2^2 .

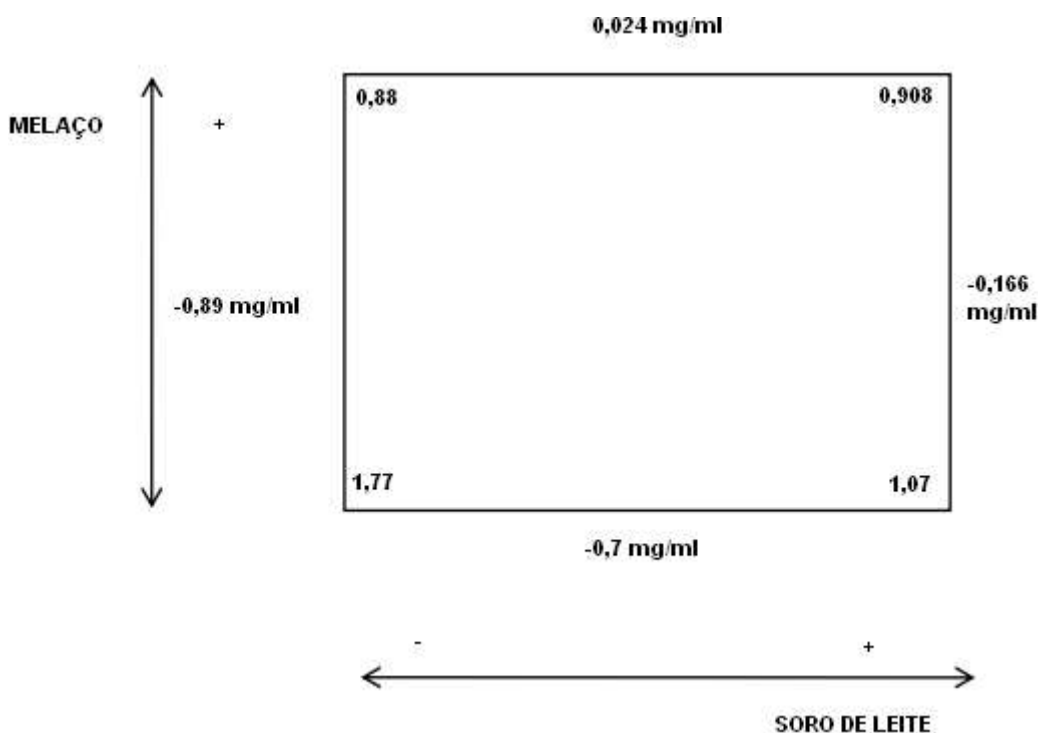


Figura 07 - Representação geométrica dos efeitos do planejamento fatorial 2^2 para avaliação da concentração de proteínas do *B. thuringiensis* utilizando melaço como fonte de carbono e soro de leite como fonte de nitrogênio.

Analisando a Tabela 08 e a Figura 07 é possível observar que nos experimentos 1 e 2 os quais utilizaram o soro de leite na maior concentração 2% m/v, quando o melaço de cana de açúcar aumenta de 0,3% para 0,5 % a concentração de proteína total extracelular diminui em 0,166 mg/l (+1,074-0,908). A mesma análise foi feita quando o soro de leite foi mantido no nível inferior (0,5%) e a concentração de melaço variou de 0,3% para 0,5%, experimento 3 e 4. Nesta situação ocorreu uma diminuição de 0,89 mg/l de proteína total extracelular (+0,88-1,77). O efeito global apresentado pela variável melaço de cana de açúcar foi igual a $-0,528 = [(-0,166-0,89)/2]$. Desta forma o

aumento da concentração de melaço de cana de açúcar diminuiu a concentração de proteína total no meio de cultivo.

O efeito do aumento da concentração do soro de leite pode ser observado nos experimentos 3 e 1. Nestes a concentração de melaço foi mantida constante 0,3%, e a concentração de soro de leite variou de 0,5 para 2,0 %, respectivamente. O aumento da concentração de soro de leite provocou uma queda de 0,7 mg/ml (+1,774-1,074). Outra análise foi feita quando a concentração de melaço de cana de açúcar foi mantida no nível superior 0,5% e a concentração de soro de leite variou de 0,5 para 2,0%, ensaios 4 e 2 respectivamente. Para esta situação foi observada um aumento de 0,024 mg/mL (+0,908-0,884). O efeito global apresentado pela variável melaço de cana de açúcar foi de -0,338 mg/mL (-0,7+0,024)/2].

A dosagem de proteína total foi uma tentativa de inferir a produção das proteínas Cyt e Cry. Entretanto não podemos correlacionar a produção destas proteínas nos diferentes meios de cultivos, testes específicos para identificar a presença destas proteínas não foram realizados.

O efeito da segunda ordem para associação entre as variáveis, a associação do melaço de cana de açúcar como fonte carbono e do soro de leite como fonte de nitrogênio não foi favorável para síntese de proteínas. As duas variáveis influenciaram negativamente na produção das proteínas.

A fonte de carbono para cultivo de *B. thuringiensis* varia muito conforme o objetivo da fermentação e a linhagem da bactéria a qual está sendo cultivada. Muitos trabalhos relatam que a melhor fonte para o crescimento vegetativo não quer dizer que também seja a melhor fonte para esporulação e formação de cristais, o que é afirmado pelo IÇGEN *et al.*, (2002) e OSKAN *et al.*, (2003) . A maioria dos trabalhos revela que a melhor fonte para crescimento vegetativo não corresponde à melhor fonte para esporulação e formação dos cristais protéicos.

De acordo com IÇGEN (2002) altas concentrações de fonte de carbono/glicose podem inibir a síntese da δ -endotoxina. De acordo com este trabalho, as melhores fontes de carbono para produção dos cristais tóxicos e esporulação são lactose, sacarose e

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

O manganês e o magnésio influenciam o metabolismo secundário, portanto, com efeito na produção das proteínas Cry. Sua concentração ideal é em torno de 10^{-3} mol/l. O cálcio é importante no processo de esporulação, promovendo a estabilidade do cristal protéico. A concentração de 10^{-3} mol/l de cálcio estimula a esporulação, mas é inibidora para o crescimento vegetativo e síntese protéica. Ao que parece, o cálcio não é essencial para a síntese das proteínas Cry. (IÇGEN *et al.*, 2002). Metais-traço como zinco, cobre e ferro apresentam resultados negativos para o crescimento, esporulação e produção de toxina Cry mesmo em concentrações pequenas (IÇGEN *et al.*, 2002., OSKAN *et al.*, 2003).

Diante dos resultados obtidos das análises de densidade óptica e método de lowry e a partir da avaliação dos mesmos pelo planejamento fatorial 2^2 , pode-se inferir que não necessariamente as células e esporos que possuem crescimento celular satisfatório possuem alta síntese de proteínas/toxinas, tal fato está associado ao tipo e concentração utilizada da fonte de carbono ou fonte de nitrogênio. A fonte de carbono ou nitrogênio utilizada pode inibir/incentivar o crescimento celular ou a biossíntese de δ -endotoxina, o que corroborou aos estudos realizados por CORINA *et al* (2017), ARCAS *et al* (1984), IÇGEN *et al* (2002), OSKAN *et al* (2003) e ZOUARI *et al* (1999).

6. CONCLUSÕES

Devido às suas características biológicas e a vasta gama de patogenicidade contra insetos, o *B. thuringiensis* destaca-se como a principal bactéria utilizada no controle biológico. No entanto, a utilização deste entomopatógeno é pouco utilizada no Brasil, quando comparada aos países desenvolvidos, sendo necessária a divulgação de produtos, implementação de produções regionais, as quais diminuem o custo e o estabelecimento de incentivos para implantação de programas de manejo integrado de insetos (MIPs).

Neste estudo, foi observado que o melaço de cana de açúcar e o soro de leite podem ser utilizados como fontes alternativas para produção do *B. thuringiensis*. A melhor condição para produção de biomassa foi a que utilizou o melaço de cana de açúcar na concentração de 0,3% e soro de leite na concentração de 0,5%. Interessante destacar que esta condição produziu uma densidade ótica 13,35% maior que a empregando o meio padrão. Desta forma o meio alternativo elaborado neste trabalho é uma possibilidade para diminuir os custos de produção do bioinseticida a base de *B. thuringiensis*, o que pode incentivar maior utilização do mesmo acarretando uma possibilidade de reutilização dos resíduos industriais e por fim menor poluição ambiental.

7. PERSPECTIVAS

Avaliar a produção de massa seca, produção de endotoxinas e esporos utilizando os resíduos agroindustriais, soro de leite e melaço de cana de açúcar;

Testar concentrações inferiores a 0,3% e 0,5% para o melaço de cana de açúcar e soro de leite, respectivamente;

Otimizar as condições de cultivo incorporando novos fatores como temperatura, pH, velocidade de agitação;

Realizar bioensaios para avaliar a patogenicidade do bioinseticida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAPA. **Ouro fino agronegócio - Bula**. Ministério da cultura, pecuária e abastecimento. 2017.
- AKRAM, W., MAHBOOB, A., JAVED, A. ***Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against fusarium wilt**. European Journal of Microbiology and Immunology, 34, p. 275–280, 2013.
- ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL. **Os alimentos mais saudáveis do mundo**. 2008. Disponível em: <http://www.alimentacaosaudavel.org/melaco.html>. Acessado em: 09 de maio de 2017.
- ALVES, L., ALVES, S., CAPALBO, D. **Seleção de Matéria Prima para a Elaboração de Meio de Cultura para Produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner**. Departamento de Entomologia – USP. Piracicaba, SP, 1997.
- ALVES, M. **Identificação e caracterização de genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* em isolados de *Bacillus thuringiensis* e toxicidade em larvas de *Anthonomus***. Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. Campus de Jaboticabal. 2001.
- ANDRADE, C., GUTIERREZ, M., CABRINI, I., FREITAS A., GALBINI, M.. **Uma Comparação entre Vectobac AS e Bt-horus para Larvas de *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller)**. Página na Internet: Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP. 2007. Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm Acesso em: 09 de maio de 2017.
- ANDRADE, M. **Otimização de um meio de cultura para produção de poligalacturonases pelo termófilo *Bacillus* sp. SMIA-2 e propriedades da enzima**. Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes – RJ, 2009.
- ANGELO, E., VILAS-BÔAS, G., GÓMEZ, R.. ***Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958. 2010.
- BARROS, I. **Materiais cirúrgicos são produzidos a partir de reação química com o melaço da cana-de-açúcar**. UFPE – Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitaria – Recife, 2005.
- BETTIOL, W., MORANDI, M. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Embrapa – Meio ambiente. Jagariuna, SP. 2009.
- BOBROWSKI, V., FIUZA, L., PASQUALI, G. ***Bacillus thuringiensis* genes: an approach to confer insect resistance to plants**. Cienc. Rural vol.33 no.5 Santa Maria Sept./Oct. 2003.

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

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.

BREWER, M., GOODELL, B. **Approaches and incentives to implement integrated pest management that addresses regional and environmental issues.** Annual Review of Entomology, v.57, p.41-59, 2012.

BUENO, V., JUNIOR, A., SILVEIRA, L. **Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável.** Departamento de Entomologia - UFLA (Apostila).

CABINER INTERNATIONAL CENTRE. **The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary.** Wallingford: CAB International Centre, 2010. 40p.

CHICHESTER, O. **Advances in Food Research (Advances in Food and Nutrition Research).** Academic Press. ISBN 0-12-016430-2. Boston, 1986.

COHEN, Z. ***Bacillus thuringiensis*, bio-pesticide.** Cornell University. 2015.

CORREIA, R. **Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus Thuringiensis* subsp. *israelenses* para diferentes linhagens de células tronco de inseto e de mamífero.** Universidade de Brasília – Departamento de biologia celular. Brasília, 2012.

CORINA, V., SANTOS, M. FREIRE, F. VALICENTE, F. **Produção de biopesticida de *Bacillus thuringiensis* usando meio comercial de laboratório e meios alternativos agrícolas como fonte de nutrientes.** Graduandas de Ciências Biológicas, MG, Brasil 2 - PhD, Embrapa Milho e Sorgo. 2017.

COSTA, A., BRITO V., FONTENELLE, S., PEIXOTO, O., VIEIRA, F. **Uso de soro de leite bovino para elaboração de meios de cultura para *Staphylococcus aureus*.** Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2012.

COSTA, C., LINS, M. VEIGA, R., LIMA, F. **Soro do leite e os danos causados ao meio ambiente.** Departamento de Engenharia Ambiental – Faculdade Integrada Tiradentes. Maceió – AL, 2014.

COSTA, M. **Caracterização molecular de genes cyt de cepas de *Bacillus Thuringiensis* e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas a *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.

COSTA, M., PAIVA, L., VALICENTE, F. **Isolamento de Proteínas Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* por Gradiente de Sacarose.** Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, 2011.

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

CUNICO, W., CUNICO, M., MIGUEL, O., ZAWADZKI, S. **Planejamento fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica**. Visão Acadêmica, v.9, n.1, ISSN 1518-5192. Curitiba, 2008.

DIAS, J. **Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos**. Controle Biológico Centro Nacional de pesquisas de Recursos Genéticos e Biotecnologia, CENARGEN/EMBRAPA. Brasília – DF, 1994.

ELIAS, D. **Aplicações de planejamento de experimento para dados não normais**. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza – Departamento de Métodos estatísticos. Rio de Janeiro, 2014.

GALLO, L. **Catabolismo e Bioenergética**. 2015. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallobioenergetica.html>. Acessado em: 09 de maio de 2017.

GESTAO NO CAMPO. **Soro de leite desaproveitado pode tornar-se fonte de poluição**. Disponível em: <http://www.gestaonocampo.com.br/biblioteca/soro-de-leite-desaproveitado-pode-tornar-se-fonte-de-poluicao/>. Acessado em: 09 de maio de 2017.

GLARE, T.R., O'CALLAGHAM, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester, John Wiley & Sons, 350p, 2000.

IÇGEN, Y., IÇGEN, B., ÖZCENGİZ, G. **Regulation of crystal protein biosynthesis by Bacillus thuringiensis: I Effects of mineral elements and pH**. Research in Microbiology, Paris, v. 153, n. 9, p. 599-604, 2002.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM**. Crops: 2013. Ithaca: ISAAA, 2014. 37p.

JARDINE, J. **Biotecnologia**. PUC – Pontifícia Universidade Católica - Centro de ciências da vida. Campinas, 2011.

JÚNIO, A., VERGUTZ, E., ISEWAKI, H., ÁVILA, L., SOARES, W. **Controle biológico de pragas com microrganismos**. Faculdade de Engenharias e Ciências Agrárias do Centro Universitário de Patos de Minas. Patos de Minas, 2010.

LAPORTA, M. **Microbiologia – Atividades Práticas**. 2007.

LIMA, G. **Proteínas bioinseticidas produzidas por Bacillus Thuringiensis**. Universidade Federal de Pernambuco - Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, vol. 7, p.119-137, 2010.

MIZUBUTI, I. **Soro de leite: Composição, processamento e utilização na alimentação**. Semina: Ci. Agr., Londrina, v.15, n.1, p.80-94, 1994.

OZTURK, A. **Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis***. Journal of Hazardous Materials, v.147, p. 518–523, 2007.

PALLINI, A. **Controle biológico de pragas e seu uso em cultivos protegidos..** Espaço do produtor. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

PRAÇA, L., BATISTA, A. MARTINS, E., SIQUEIRA, C., DIAS, G., GOMES, C., FALCÃO, R., MONNERAT, R. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Pesq. Agropec. vol.39 no. ISSN 1678-3921. Brasília, 2004.

PRAÇA, L., SOARES, E., MONTAGNER, M., MONNERAT, R. ***Bacillus thuringiensis berliner* (Eubacteriales: bacillaceae): Aspectos gerais, modo de ação e utilização.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília - DF, 2007.

PEARSON EDUCATION. **Sporulation and Germination.** Figure 4.21a. Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm. 2010. Acesso em: 09 de maio de 2017.

POLANCZYK, R., ALVES, S., PADULLA, L. **Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** Biopesticides International, v. 1, n. 1/2, p. 114-124, 2005.

POORNIMA, K., SELVANAYAGAM, P., SHENBAGARATHAI, R. **Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells.** Journal of Applied Microbiology, v.109, p.348-54, 2010.

PRESCOTT, L. **Microbiology.** Wm. C. Brown Publishers, ISBN 0-697-01372-3. 1993

MENEZES, I. ***Bacillus thuringiensis*.** Defesa Vegetal. Disponível em: <http://www.defesavegetal.net/bacillus-thuringiensis>. Acesso em: 09 de maio de 2017.

MORRIS, O., KANAGARATNAM, P., CONVERSE, V. **Suitability of 30 agricultural products and by-products as nutrient sources for laboratory production of *Bacillus thuringiensis* subsp.** Aizawai (HD133). Journal of invertebrate pathology, Orlando, v. 70, n. 2, p. 113-120, 1997.

OSKAN, M., DILEK, F. B., YETIS, U., OZCENGİZ, O. **Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production.** Research in Microbiology, Paris, v. 154, n. 1, p. 49-53, 2003.

REBELATO, M., MADALENO, L., RODRIGUES, A. **Ponderação do impacto ambiental dos resíduos e subprodutos da produção industrial sucroenergética.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. ISSN 1808-0448 - v. 09, n. 02: p. 392-415. Paraná, 2013.

KOGAN, M. **Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments.** Annual Review of Entomology, v.43, p.243–270, 1988.