

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Obtenção de bioinseticida a partir
de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
e aplicação de bioensaios
em culicídeos

SAMARA ERNANDES

Tese de doutorado
2004



Instituto de Química

SAMARA ERNANDES

Obtenção de bioinseticida a partir
de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
e aplicação de bioensaios
em culicídeos

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Iracema de Oliveira Moraes
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

ARARAQUARA
-2004-

DADOS CURRICULARES

SAMARA ERNANDES

1. DADOS PESSOAIS

NASCIMENTO: 6.11.1971 – SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

NACIONALIDADE: Brasileira

NATURALIDADE: São José do Rio Preto – SP

ESTADO CIVIL: solteira

FILIAÇÃO: Miguel Ernandes

Celisa Molers Ernandes

PROFISSÃO: Bióloga

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: 19.871.903

CADASTRO DE PESSOA FÍSICA (CIC): 121.505.548/01

ENDEREÇO RESIDENCIAL: Av. Aniloel Nazareth, 4606, CEP 15070-230, São José do Rio Preto – SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Biologia, Curso de Ciências Biológicas, concluído em 07/12/1992 no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP – São José do Rio Preto.

Licenciado em Biologia, Curso de Ciências Biológicas, concluído em 15/12/1994 no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP – São José do Rio Preto.

Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, concluído em 24/09/1998 no Instituto de Química - UNESP – Araraquara.

Doutor em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, concluído em 14/06/2004 no Instituto de Química - UNESP – Araraquara.

3. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

CARDOSO JÚNIOR, R.P., SCANDAR, S.A.S, MELLO, N.V., ERNANDES, S., BOTTI, M.V., NASCIMENTO, E.M.M. Detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na zona urbana do município de Catanduva-SP, após controle de epidemia de dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, nº 01, p.37-40, 1997.

ERNANDES, S., MORAES, I.O. Utilização de sangue de abatedouros para produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação submersa. Revista Holos Environment. Rio Claro-SP, v. 01, p. 60-66, 2001.

4. TRABALHO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

ERNANDES, S., DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., OSHIRO, A., FLEMING, R. G., FOCHI, R. A., SEIXAS, R. Produção de bioinseticidas utilizando água de maceração de milho e triptose como meios de cultura. Trabalho submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Dedicatória

Dedico esta tese a pessoas muito importantes na minha vida:

Miguel e Celisa

*Vocês deixaram seus sonhos para que eu sonhasse.
Derramaram lágrimas para que eu fosse feliz.
Perderam noites de sono para que eu dormisse tranquilo.
Acreditaram em mim, apesar dos meus erros.
Ser educador é ser um poeta do amor.
Jamais esqueçam que eu levarei para sempre
Um pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser...*

Beatriz, Isabela e Davi

*A vocês, meus queridos filhos, que com seu amor e vivacidade, renovam
e enriquecem minha vida...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por acompanhar-me em todos os momentos de minha vida.

À Prof^a Dr^a Iracema de Oliveira Moraes, primeiramente pelo acolhimento generoso em orientar-me e, sobretudo pela segurança que me transmitiu durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, por conceder-me o Laboratório de Bioprocessos da UNESP - São José do Rio Preto para a realização da parte prática deste trabalho, além da orientação salutar e amigável.

Aos técnicos João Carlos C. de Oliveira, Tânia Maria Vinturim, Ginaldo Vieira dos Santos e Luiz Carlos Camolezi, pelo constante auxílio.

Ao amigo Marcelo Andrés Umsza Guez, pela convivência agradável no laboratório e pelo auxílio.

Às estudantes de Engenharia de Alimentos Kelly Yamaoka e Angélica Oshiro, aos estudantes de Biologia Rodrigo Fleming e Ricardo Fochi, e à bióloga Roberta Seixas, não só pela ajuda na rotina laboratorial, mas, sobretudo pela amizade.

Ao abatedouro Boi Rio, a minha gratidão pela concessão do sangue de bovinos.

A Refinações de Milho Brasil, pela concessão da milhocina.

À Farinheira Plaza, pela concessão dos resíduos do processamento da mandioca.

A SUCEN, pelo auxílio na realização dos bioensaios.

Ao meu irmão Marsel e à minha cunhada Fernanda pelo apoio e compreensão.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Boa tese nem é a que, com ares de fácil, se entrega, sem nenhum obstáculo ao leitor, tampouco é a que, misteriosa em demasia, se fecha à produção de sua compreensão. Boa tese é a que, desafiando o leitor, provoca nele a alegria de lê-la. Esta é (pretende ser¹) assim”.

Paulo Freire

¹ Nota da autora

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) gera certas toxinas com ação inseticida que podem ser usadas no controle de doenças transmissíveis através de culicídeos, especialmente o *Aedes aegypti*, vetor da dengue. Este bioinseticida tem sido produzido através de fermentação submersa e, no Brasil, esta produção tem sido realizada através de pequenos centros de investigação e, mais recentemente, por uma pequena empresa.

Para a implementação de um programa de controle de vetores viável através de bioinseticidas, alguns estudos sobre meio de cultura são essenciais para unir eficiência e baixos custos.

Assim, tem-se utilizado resíduos ou subprodutos agroindustriais como fontes de nutrientes em meio de cultura.

Neste estudo, alguns resíduos e subprodutos tais como água de maceração de milho (“milhocina”), um subproduto do processamento industrial do milho, “manipueira”, um subproduto do processamento da farinha de mandioca e sangue bovino oriundo de abatedouros foram avaliados com o intuito de se verificar a eficiência em processo fermentativo para obtenção de bioinseticidas. O crescimento celular foi avaliado por densidade óptica a 620 nm, a produção de esporo por plaqueamento em ágar nutriente e a CL₅₀ (Concentração letal média), por bioensaios contra larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*. Foi verificado, em estudos com “manipueira”, que quando este subproduto é utilizado em baixa concentração, há o mesmo ou um melhor efeito do que quando se utiliza em concentração alta. A esterilização parece ser necessária ao processo fermentativo, pois quando se comparam ambos os meios de “manipueira”, um submetido à esterilização e outro sem este processo, o primeiro produziu mais esporos e uma melhor eficiência em bioensaios. Da mesma forma, quando o sangue de bovinos é acrescentado ao meio de “manipueira”, há um aumento no número de esporos e efetividade contra larvas de *Ae. aegypti*.

Foram comparadas uma fonte de nitrogênio tradicional, a peptona, com a alternativa, a “manipueira”, com e sem solução de sais e glicose, testados separadamente e em conjunto. Em ambos os meios, os sais tiveram importância, mas a glicose pareceu não ser necessária.

Palavras-chave: Bioinseticidas; resíduos agroindustriais; *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) generates certain toxins with pesticidal action, which can be used on the control of transmissible diseases by culicids, specially *Aedes aegypti*, the dengue's vector. This biopesticide has been produced by submerged fermentation and, in Brazil, this production has been made by very little research centers and, more recently, by a unique small enterprise. For the implementation of a viable vectors control program through bioinsecticides, some studies about culture media are essential in order to join efficiency and low costs. So, agroindustrial wastes or by-products have been utilized as nutrient source for the culture media production. In this study, some wastes and by-products like corn steep liquor ("milhocina"), a corn industrial processing by-product, "manipueira", a by-product from cassava flour processing and cattle blood proceeding from slaughterhouses were utilized as substrate in order to verify the efficiency on fermentative process to obtain bioinsecticides. Cellular growth was evaluated by optical density at 620 nm, spore production by pour plate count and LC₅₀ by bioassays against 4th instar larvae. It was verified, in studies with "manipueira", that a low concentration of this by-product has the same or better effect compared with high concentrations. The sterilization was a requisite to the fermentative process because when compared both sterilized and no sterilized "manipueira" media, the first yielded more spores and better efficiency in bioassays. Likewise, when cattle blood is added to "manipueira" media, there is an increase on the spores number and effectiveness against *Ae. aegypti* larvae. It was compared a traditional nitrogen source, peptone, with "manipueira", with and without salts and glucose, tested separately and joined. In both media, salts had an importance, but the glucose didn't seem necessary.

Keywords: Bioinsecticides; agroindustrial wastes; *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . | 17 |
| Figura 2 | - Casos notificados de dengue por semana epidemiológica segundo região, Brasil, 2003-2004*. | 31 |
| Figura 3 | - Sorotipos circulantes do vírus da dengue por Estados, Brasil, 2003*. | 31 |
| Figura 4 | - Casos notificados de dengue por semana epidemiológica, região sudeste, 2003*. | 32 |
| Figura 5 | - Modo de ação da toxina. | 37 |
| Figura 6 | - Comparação do crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em sangue de ave e em sangue de suíno na concentração de 100 g/l e glicose 6 g/l. | 58 |
| Figura 7 | - Crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por triptose e triptose + glicose. | 65 |
| Figura 8 | - Variação de pH em meios compostos por triptose e triptose + glicose. | 65 |
| Figura 9 | - Crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por milhocina e milhocina + glicose. | 68 |
| Figura 10 | - Variação de pH em meios compostos por milhocina e milhocina + glicose. | 68 |
| Figura 11 | - Número de larvas mortas por meio de cultura em cada uma das concentrações testadas. | 71 |
| Figura 12 | - Fluxograma da produção de farinha de mandioca. | 78 |
| Figura 13 | - Crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por manipueira nas concentrações de 25, 50, 75, 125 e 175 mL/L. | 83 |
| Figura 14 | - Variação de pH durante crescimento de <i>Bti</i> . em meios compostos por manipueira nas concentrações de 25, 50, 75, 125 e 175 mL/L. | 84 |
| Figura 15 | - Crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por manipueira nas concentrações de 175, 250, 325 e 400 mL/L. | 85 |
| Figura 16 | - Variação de pH em meios compostos por manipueira nas concentrações de 175, 250, 325 e 400 mL/L. | 86 |
| Figura 17 | - Crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L. | 87 |
| Figura 18 | - Esporos de <i>Bti</i> formados durante processo fermentativo em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L. | 87 |
| Figura 19 | - Variação de açúcar redutor durante crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L. | 88 |
| Figura 20 | - Variação da DQO durante crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L. | 89 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figura 21 - | Número de larvas mortas em cada uma das sete diluições realizadas com as concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L. | 90 |
| Figura 22 - | Crescimento de <i>Bti</i> em meios compostos por manipueira e peptona complementados com glicose e/ou solução salina | 98 |
| Figura 23 - | Crescimento de <i>Bti</i> em meios de cultura compostos por manipueira 40% e pura, nas formas estéril e não estéril. | 106 |
| Figura 24 - | Produção de esporos de <i>Bti</i> em meios de cultura compostos por manipueira 40% e pura, nas formas estéril e não estéril. | 107 |
| Figura 25 - | Redução da DQO durante crescimento de <i>Bti</i> em meios de cultura compostos por manipueira 40% e pura, nas formas estéril e não estéril. | 108 |
| Figura 26 - | Crescimento de <i>Bti</i> em meios de cultura compostos por resíduos de abatedouros, tinalizados ou não e farinheiras. | 113 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|-----|
| Tabela 1 - | Casos notificados de dengue clássico por região e unidade federada (UF) de residência nos meses de janeiro a março, Brasil, 2003-2004. | 33 |
| Tabela 2 - | Número de casos de dengue na região de São José do Rio Preto – SP. | 33 |
| Tabela 3 - | CL ₅₀ e produção de esporos em meios de milhocina e triptose. | 72 |
| Tabela 4 - | Características físico-químicas de manipueira de indústrias de processamento de mandioca no Estado de São Paulo (média de diversas amostragens). | 79 |
| Tabela 5 - | CL ₅₀ dos meios contendo diferentes concentrações de manipueira. | 90 |
| Tabela 6 - | CL ₅₀ e produção de esporos em meios contendo peptona e manipueira, suplementados ou não com glicose e sais. | 99 |
| Tabela 7 - | CL ₅₀ dos meios testados contendo manipueira estéril e sem esterilização em duas diferentes concentrações. | 108 |
| Tabela 8 - | CL ₅₀ e número de esporos nos meios à base de manipueira e sangue. | 114 |

LISTA DE FOTOS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Foto 1 - | Esporângio de <i>Bti</i> antes do final do processo de esporulação, visualizado por microscopia eletrônica. | 35 |
| Foto 2 - | Técnica da “micro-gota”: placas de contagem de colônias de <i>Bti</i> em diluições variadas. | 48 |
| Foto 3 - | Larva de <i>Aedes aegypti</i> . | 49 |
| Foto 4 - | Pupa de <i>Aedes aegypti</i> . | 49 |
| Foto 5 - | Adulto de <i>Aedes aegypti</i> . | 49 |
| Foto 6 - | Armadilhas ovitrampas. | 49 |
| Foto 7 - | Paletas de eucatex. | 49 |
| Foto 8 - | Acondicionamento das palhetas no laboratório após recolhimento nos domicílios. | 50 |
| Foto 9 - | Separação das larvas de <i>Aedes aegypti</i> de mesmo instar para utilização nos bioensaios. | 51 |
| Foto 10 - | Larvas em potes de plástico com 150 mL de água. | 51 |
| Foto 11 - | Adição das diluições de cada produto nos potes com 150 mL de água. | 51 |
| Foto 12 - | Visualização de esporos e cristais em meio de triptose com glicose, em 120 horas do processo fermentativo. | 66 |
| Foto 13 - | Visualização de esporos e cristais em meio de triptose sem glicose, em 120 horas do processo fermentativo. | 67 |
| Foto 14 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “milhocina” com glicose, em 120 horas do processo fermentativo. | 69 |
| Foto 15 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “milhocina” sem glicose, em 120 horas do processo fermentativo. | 70 |
| Foto 16 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 40%, em 120 horas do processo fermentativo (M 400). | 91 |
| Foto 17 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 50%, em 120 horas do processo fermentativo (M 500). | 92 |
| Foto 18 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 60%, em 120 horas do processo fermentativo (M 600). | 92 |
| Foto 19 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 70%, em 120 horas do processo fermentativo (M 700). | 93 |
| Foto 20 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 80%, em 120 horas do processo fermentativo (M 800). | 93 |
| Foto 21 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 90%, em 120 horas do processo fermentativo (M 900). | 94 |
| Foto 22 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 100%, em 120 horas do processo fermentativo (M 1000). | 94 |
| Foto 23 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira”, na concentração de 175 mL/L e glicose, na concentração de 8 g/L, em 120 horas do processo fermentativo (M+G). | 100 |
| Foto 24 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira”, na concentração de 175 mL/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (M+S). | 100 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Foto 25 - | Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira”, na concentração de 175 mL/L, glicose, na concentração de 8 g/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (M+S+G). | 101 |
| Foto 26 - | Visualização de células vegetativas em meio de peptona, na concentração de 4 g/L e glicose, na concentração de 8 g/L, em 120 horas do processo fermentativo (P+ G). | 101 |
| Foto 27 - | Visualização de esporos e cristais em meio de peptona, na concentração de 4 g/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (P+ S). | 102 |
| Foto 28 - | Visualização de esporos e cristais em meio de peptona, na concentração de 4 g/L, glicose, na concentração de 8 g/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (P+ S+ G). | 102 |
| Foto 29 - | Contaminante (hifa) em meio de “manipueira” 40%, sem esterilização (MS 400). | 109 |
| Foto 30 - | Contaminante (hifas) em meio de manipueira 100%, sem esterilização (MS 1000). | 109 |
| Foto 31 - | Visualização de esporos e cristais em meio contendo 90% de manipueira e 10 % de sangue bovino tinalizado (meio 90M10S (T)). | 115 |
| Foto 32 - | Visualização de esporos e cristais em meio contendo 90% de manipueira e 10 % de sangue bovino (meio 90M10S). | 116 |
| Foto 33 - | Visualização de células em meio contendo 70% de manipueira e 20 % de sangue bovino (meio 70M20S). | 116 |
| Foto 34 - | Visualização de esporos e cristais em meio contendo 70% de manipueira e 20 % de sangue bovino tinalizado (meio 70M20S (T)). | 117 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------|--|----|
| Quadro 1 - | Características gerais dos organoclorados. | 24 |
| Quadro 2 - | Características gerais dos organofosforados. | 25 |
| Quadro 3 - | Características gerais dos carbamatos. | 25 |
| Quadro 4 - | Características gerais dos piretróides. | 26 |
| Quadro 5 - | Quadro sinóptico dos praguicidas utilizados atualmente no controle de vetores e hospedeiros intermediários no Estado de São Paulo. | 28 |
| Quadro 6 - | Efeitos tóxicos provocados pelos praguicidas utilizados na área da Saúde. | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| LISTA DE FIGURAS | 4 |
| LISTA DE TABELAS | 6 |
| LISTA DE FOTOS | 7 |
| LISTA DE QUADROS | 9 |
| SUMÁRIO | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 OBJETIVOS | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 Dengue | 16 |
| 2.1.1 <i>Aedes aegypti</i> | 16 |
| 2.1.2 Histórico do controle da dengue | 18 |
| 2.2 Praguicidas | 19 |
| 2.2.1 Definição e Aplicação na área da saúde | 19 |
| 2.2.2 A origem dos praguicidas | 20 |
| 2.2.3 Os sinais de advertência | 21 |
| 2.2.4 Em busca da modernidade | 22 |
| 2.2.5 Classificação quanto à natureza química | 23 |
| 2.2.6 Formulação | 26 |
| 2.2.7 Principais praguicidas utilizados no controle de vetores e hospedeiros intermediários no Estado de São Paulo | 27 |
| 2.2.8 Toxicidade | 28 |
| 2.2.9 Dados toxicológicos agudos | 30 |
| 2.3 Situação atual da dengue no Brasil e no Estado de São Paulo | 30 |
| 2.4 Controle biológico | 35 |
| 2.5 Produção do bioinseticida | 37 |
| 2.6 Resíduos ou sub-produtos agroindustriais | 39 |
| 2.7 Efetividade do <i>Bti</i> no controle de pragas | 41 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4 TRABALHO PUBLICADO: UTILIZAÇÃO DE SANGUE DE ABATEDOUROS PARA PRODUÇÃO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA. | 52 |
| INTRODUÇÃO | 54 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 56 |
| RESULTADOS E CONCLUSÕES | 58 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

| | |
|--|----|
| 5 TRABALHO SUBMETIDO: PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO E TRIPTOSE COMO MEIOS DE CULTURA | 61 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 61 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 5.2.1 Inóculo e Fermentação | 64 |
| 5.2.2 Parâmetros acompanhados | 64 |
| 5.3 RESULTADOS | 64 |
| 5.3.1 Experimentos com triptose, com e sem glicose. | 64 |
| 5.3.2 Experimentos com “milhocina”, com e sem glicose. | 68 |
| 5.4 DISCUSSÃO | 72 |
| 5.5 CONCLUSÃO | 74 |
| 5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 74 |
| 6 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA. | 77 |
| 6.1 INTRODUÇÃO | 77 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 81 |
| 6.2.1 Preparo do inoculo | 81 |
| 6.2.2 Meios de cultura | 81 |
| 6.2.3 Parâmetros acompanhados | 82 |
| 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 82 |
| <u>6.3.1 Primeira etapa</u> | 82 |
| 6.3.1.1 Crescimento celular | 82 |
| 6.3.1.2 pH | 83 |
| <u>6.3.2 Segunda etapa</u> | 84 |
| 6.3.2.1 Crescimento celular | 84 |
| 6.3.2.2 pH | 85 |
| <u>6.3.3 Terceira etapa</u> | 86 |
| 6.3.3.1 Crescimento celular | 86 |
| 6.3.3.2 Determinação da quantidade de esporos | 87 |
| 6.3.3.3 Determinação da variação de açúcar redutor | 88 |
| 6.3.3.4 Determinação da variação da DQO | 89 |
| 6.3.3.5 Bioensaios | 89 |
| 6.3.3.6 Verificação de esporos e cristais por microscopia | 91 |
| 6.4 CONCLUSÃO | 95 |
| 7 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO MANIPUEIRA E PEPTONA COM E SEM A ADIÇÃO DE SAIS MINERAIS E GLICOSE | 96 |
| 7.1 INTRODUÇÃO | 96 |
| 7.2 MATERIAL E MÉTODOS | 96 |
| 7.2.1 Preparo do inoculo e fermentação | 96 |
| 7.2.2 Parâmetros acompanhados | 97 |

| | |
|---|-----|
| | 12 |
| 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 97 |
| 7.3.1 Crescimento celular | 97 |
| 7.3.2 Produção de esporos e cristais | 98 |
| 7.4 CONCLUSÃO | 103 |
| 8 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO MANIPUEIRA ESTÉRIL E NÃO ESTÉRIL NA CONCENTRAÇÃO DE 400 mL/L E NA SUA FORMA PURA | 104 |
| 8.1 INTRODUÇÃO | 104 |
| 8.2 MATERIAL E MÉTODOS | 104 |
| 8.2.1 Preparo do inóculo e fermentação | 104 |
| 8.2.2 Parâmetros acompanhados | 105 |
| 8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 105 |
| 8.3.1 Crescimento celular | 105 |
| 8.3.2 Determinação da quantidade de esporos | 106 |
| 8.3.3 Determinação da variação da DQO | 107 |
| 8.3.4 Bioensaios | 108 |
| 8.3.5 Verificação de esporos e cristais por microscopia | 105 |
| 8.4 CONCLUSÃO | 110 |
| 9 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO RESÍDUOS DE ABATEDOUROS E FARINHEIRAS | 111 |
| 9.1 INTRODUÇÃO | 111 |
| 9.2 MATERIAL E MÉTODOS | 112 |
| 9.2.1 Preparo do inóculo e fermentação | 112 |
| 9.2.2 Parâmetros acompanhados | 113 |
| 9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 113 |
| 9.3.1 Crescimento celular | 113 |
| 9.4 CONCLUSÃO | 117 |
| 10 QUADRO GERAL DE RESULTADOS OBTIDOS | 118 |
| 11 SUGESTÃO PARA ESTUDO FUTURO | 118 |
| 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 119 |

1 INTRODUÇÃO

A dengue, virose que se caracteriza por um início brusco, febre que dura de 5 a 7 dias, cefaléia intensa, dores retro orbitais, articulares, musculares e erupções cutâneas eritematosas é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80 milhões de pessoas se infectem anualmente, em 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue. O mosquito transmissor do vírus da dengue, o *Aedes aegypti*, encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, através da urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro e pelas mudanças climáticas. Com essas condições, o *Ae. aegypti* espalhou-se por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo. Nas Américas, está presente desde os Estados Unidos até o Uruguai, com exceção apenas do Canadá e do Chile, por razões climáticas e de altitude. Em nosso país, as condições sócio-ambientais favoráveis à expansão do *Ae. aegypti* possibilitaram uma dispersão desse vetor, desde sua reintrodução em 1976, que não conseguiu ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados no combate às doenças transmitidas por vetores, em nosso país e no continente. Programas essencialmente centrados no combate químico, com baixíssima ou mesmo nenhuma participação da comunidade, sem integração intersetorial e com pequena utilização do instrumental epidemiológico mostraram-se incapazes de conter este vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos. Para o controle dos adultos e das larvas têm sido utilizados produtos com princípios ativos organoclorados, organofosforados e, mais recentemente, piretróides. Tais inseticidas apresentam desvantagens e restrições de uso

bem conhecidas: são tóxicos ao homem, causam desequilíbrio nos ecossistemas em que são utilizados, por atuarem sobre insetos benéficos, e quando são intensivamente usados podem promover o desenvolvimento de populações de mosquitos resistentes (Fundação Nacional de Saúde, 2001).

Aliada às dificuldades permeadas pelo controle químico, situa-se a ineficiência, à curto prazo, do processo educativo da população no que diz respeito à retirada de criadouros potenciais do mosquito, o que, de uma forma simples, praticamente extingiria a doença.

Neste sentido, faz-se importante a adoção de processos alternativos para o controle deste vetor, entre os quais, o controle biológico. Os inseticidas baseados em entomopatógenos são quase sempre específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxidez aos vertebrados e insetos benéficos. Os agentes de controle biológico mais utilizados atualmente são as bactérias, as quais são representadas pelas diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis*. Antes de 1976, esta bactéria entomopatogênica era usada exclusivamente no controle de insetos-praga na agricultura, mas a descoberta de um isolado patogênico a dípteros chamado *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), iniciou o uso desta bactéria no controle de vetores de doenças. Entre as dificuldades para a produção de um bioinseticida está o alto custo do processo. Uma das chaves para o sucesso da produção e comercialização do inseticida bacteriano tem sido o desenvolvimento do meio de cultura. A maioria dos meios de cultura empregados usa produtos naturais, como fonte de carbono, nitrogênio e sais, geralmente representados por subprodutos industriais de baixo custo, tais como melão de cana e água de maceração de milho.

Apesar de já existirem no mercado internacional muitas formulações de bactérias entomopatogênicas e algumas poucas no mercado nacional, restritas a produções artesanais, pouco investimento existe por parte das indústrias em pesquisas com inseticidas microbianos.

O resultado desse baixo investimento na área vem repercutindo diretamente na qualidade dos produtos existentes no mercado. Até mesmo os inseticidas microbianos à base de *Bti* que vêm sendo comercializados por algumas grandes companhias, necessitam, baseados nos resultados que vêm sendo obtidos, de maiores investimentos, visando a melhoria da produção, formulação, aplicação e sistema de comercialização.

Dessa forma, justifica-se toda pesquisa que vise a melhoria de todas as etapas do processo de produção de um bioinseticida, sobretudo em se tratando de pesquisas em um país onde a produção é restrita, ainda, em sua maioria, à escala laboratorial, dependendo de importações para a implementação do controle biológico à base de *Bti*.

1.1 OBJETIVOS

Os trabalhos apresentados, a seguir, incluíram o desenvolvimento do processo fermentativo para obtenção de bioinseticida à base de *Bti*. Foram estudadas as condições de fermentação, parâmetros e variáveis, bem como o uso de substratos alternativos e aproveitamento de resíduo poluente para redução de custos de produção. Os bioensaios com alguns dos bioinseticidas obtidos foram realizados contra o *Ae. aegypti*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dengue

2.1.1 *Aedes aegypti*

A dengue é uma das mais importantes arboviroses que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde pública no mundo. O principal mosquito vetor é o *Aedes aegypti*, também transmissor da febre amarela urbana. Foi dado como erradicado diversas vezes no Brasil. O primeiro registro da presença de *Ae. aegypti* no Brasil, após a campanha de erradicação encerrada no final da década de 50, data de 1967, no Pará. Em 1976, esse vetor foi detectado na cidade de Salvador/BA e no ano seguinte, no Rio de Janeiro, instalando-se definitivamente no território brasileiro (Organização Pan-Americana de Saúde, 1991; Secretaria de Estado de Saúde, 1997). No Estado de São Paulo, os primeiros registros de sua reintrodução datam de 1980, em área portuária do município de Santos. Em 1985, a espécie foi detectada em municípios da região oeste do Estado e, desde então, a infestação por *Ae. aegypti* vem se expandindo. Os mosquitos do gênero *Aedes* bem como todos os da família Culicidae, apresentam duas fases: aquática e terrestre. A fase aquática compreende o ovo, a larva e a pupa. A fase terrestre compreende o mosquito adulto.

Biologia

Ovo: os ovos são depositados pelas fêmeas fora do meio líquido, próximo à superfície da água, ficando aderidos à parede interna dos recipientes. O período para o desenvolvimento embrionário dura, em condições favoráveis, de 2 a 3 dias para eclodir.

Larva: as larvas (4 estádios) são providas de grande mobilidade e têm como função primária o crescimento. Alimentam-se de detritos orgânicos, bactérias, fungos e protozoários existentes

na água. A duração da fase larval, em condições de temperatura entre 25° C e 29° C e com boa oferta de alimentos, é de 5 a 10 dias.

Pupa: a pupa apenas respira e é dotada de boa mobilidade. A duração da fase pupal, em condições favoráveis, é de 2 dias em média.

Adulto: macho e fêmea alimentam-se de néctar e sucos vegetais, sendo que a fêmea, depois do acasalamento, necessita de sangue para maturação dos ovos. O intervalo entre a alimentação sangüínea e a oviposição varia de 2 a 3 dias. A duração do ciclo de vida, em condições favoráveis, é de aproximadamente 10 dias, a partir da oviposição até à idade adulta.

Habitat: o *Ae. aegypti* prolifera em recipientes artificiais, localizados no interior das residências ou em suas imediações, preferencialmente contendo água limpa, tais como: reservatórios de água, vasos de planta, latas, garrafas, pneus, bebedouros de animais, fontes ornamentais. Utilizam também reservatórios naturais como: ocos de árvores, bambus, cascas de coco e axilas de plantas. A Figura 1 ilustra o ciclo de vida do *Ae. aegypti*.

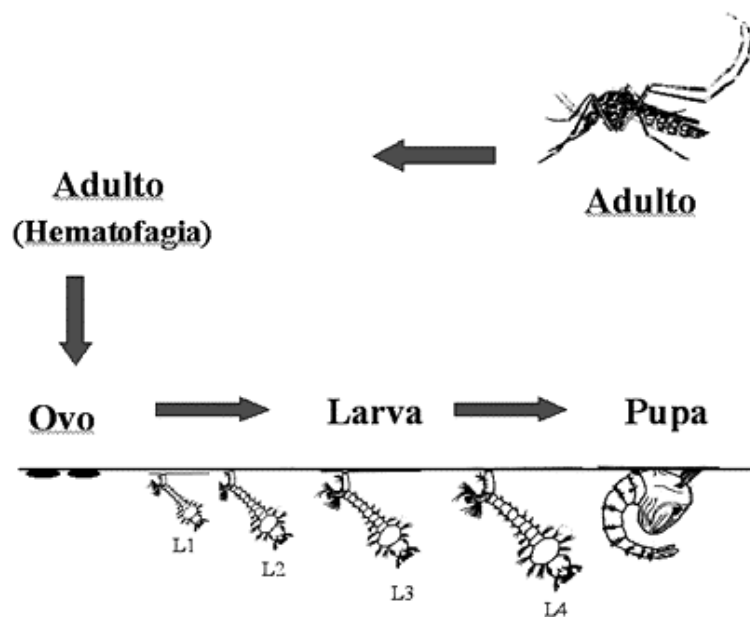


Figura 1 – Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Superintendência de Controle de Endemias –SUCEN (2004).

2.1.2 Histórico do controle da dengue

Em virtude da ineficiência do controle químico, tradicionalmente utilizado para a contenção da dengue, em 1996, o Ministério da Saúde decidiu rever a estratégia empregada contra o *Ae. aegypti* e propôs o Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa). Ao longo do processo de implantação desse programa observou-se a inviabilidade técnica de erradicação do mosquito a curto e médio prazos. O PEAa, mesmo não atingindo seus objetivos teve méritos ao propor a necessidade de atuação multissetorial e prever um modelo descentralizado de combate à doença, com a participação das três esferas de governo Federal, Estadual e Municipal. A implantação do PEAa resultou em um fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades, mas ainda com as ações de prevenção centradas quase que exclusivamente nas atividades de campo de combate ao *Ae. aegypti* com o uso de inseticidas. Essa estratégia, comum aos programas de controle de doenças transmitidas por vetor em todo o mundo, mostrou-se absolutamente incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue.

Os resultados obtidos no Brasil e o próprio panorama internacional, onde não existem evidências da viabilidade de uma política de erradicação do vetor, em curto prazo, levaram o Ministério da Saúde a fazer uma nova avaliação dos avanços e das limitações, com o objetivo de estabelecer um novo programa de controle da dengue que incorporasse elementos como a mobilização social e a participação comunitária, indispensáveis para responder de forma adequada a um vetor altamente domiciliado.

A instituição do Programa Nacional de Controle da Dengue pelo Ministério da Saúde em julho de 2002, representou um marco importante na história do controle da dengue no Brasil, uma vez que, além de redirecionar a política para controle do vetor, estabeleceu objetivos e metas consistentes, além da definição clara do papel dos três níveis de governo, incentivando

a intersectorialidade das ações. Para atingir os objetivos propostos, estabeleceu componentes de ação (visita domiciliar do agente, ações de comunicação social, engajamento de outros setores da sociedade) que, se implementados de maneira eficaz, levariam a um consumo menor de produtos químicos para o controle do vetor. Em outubro de 1998, a Fundação Nacional de Saúde promoveu um Seminário Internacional em Belo Horizonte que contou com a participação de técnicos estrangeiros, assessores da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), além de representantes de Universidades, no sentido de discutir as ações de controle de vetores e as perspectivas que poderiam ser implementadas. No final do referido encontro, assuntos relativos ao controle químico de vetores foram discutidos em uma reunião específica, incluindo a opção de se usar o controle biológico por produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) no programa de controle da dengue naqueles casos onde se verifica resistência ao inseticida organofosforado, o qual continua a ser preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para uso em água de consumo humano (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

2.2 Praguicidas

2.2.1 Definição e aplicação na área da saúde

A OMS define “pesticide” ou “plaguicida” toda substância capaz de controlar uma praga em seu sentido amplo, que possa oferecer risco ou incômodo às populações e ambiente. A denominação “pesticida” (do inglês “pesticide”), muito difundida entre nós, parece inadequada à nossa língua. Literalmente, significa “o que mata peste”, e peste, segundo os dicionários da língua portuguesa, é “qualquer doença epidêmica grave, de grande mobilidade e mortalidade”. Portanto, tem o sentido de uma doença e não de uma praga, o que torna o

anglicismo errôneo para o significado que se deseja exprimir. Assim, no presente será adotada a denominação **praguicida** (do espanhol “plaguicida”), ainda que discutível, pelo sentido literal. Calcula-se que atualmente existam cerca de 1500 substâncias diferentes com ação praguicida (ingredientes ativos) em todo o mundo, a partir das quais são produzidas inúmeras formulações. No Brasil, mais de 300 princípios ativos incluídos em mais de 2000 produtos comerciais diferentes são registrados para o uso agrícola, em sua maioria, uso domissanitário e uns poucos em Saúde Pública. Em campanhas de Saúde Pública, os praguicidas são usados no controle de vetores e hospedeiros intermediários de agentes causadores de doenças como dengue, febre amarela, malária, doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose. As formulações empregadas na área da Saúde são aprovadas para este uso pela OMS e pelo Ministério da Saúde após uma série de processos de avaliação, ao fim dos quais são tidos como adequados ou não para uso. No Brasil, a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) do Ministério da Saúde e a Secretaria de Defesa Vegetal (SDV) do Ministério da Agricultura regulam e fiscalizam a distribuição e comercialização dos praguicidas (Superintendência de Controle de Endemias, 2004).

2.2.2 A origem dos praguicidas

Os praguicidas são empregados desde a antiguidade e surgiram com a necessidade de se protegerem as colheitas dos ataques dos insetos, que a cada ano comprometiam uma parcela maior da produção. Com o passar do tempo, foram se tornando mais necessários, a fim de atender à demanda crescente de alimentos. Com a evolução da ciência, surgiram os primeiros produtos sintéticos. A partir da década de 40, apareceria uma primeira classe de praguicidas reunindo características consideradas fantásticas. Em baixas doses, resultavam em ação rápida e longo efeito residual, com a vantagem de serem menos tóxicos para o homem do que os

demais praguicidas disponíveis. O lançamento do DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) significava para muitos uma revolução no controle de pragas e seria responsável, juntamente com os adubos químicos, pelo suposto milagre da agricultura com safras recordes e produção em solos praticamente estéreis. Além do uso nos campos, o DDT mostrou-se eficaz nas cidades para o controle de insetos vetores ou incômodos, sendo aplicado pelo governo de vários países da Europa e Américas. Surgia, então, o termo DEDETIZAÇÃO, que viria a tornar-se popular, anos mais tarde, com empresas particulares oferecendo este serviço. O impacto inicial desse produto na área da Saúde e na da Agricultura proporcionou, inclusive, ao descobridor das propriedades inseticidas do DDT, Paul Müller, pesquisador da companhia suíça Geigy, o Prêmio Nobel de Química em 1948. Enquanto por todo o mundo ampliava-se o uso do DDT, surgiam outros praguicidas organoclorados cada vez mais eficientes, de longo efeito residual e com doses de aplicação ainda menores (Superintendência de Controle de Endemias, 2004).

2.2.3 Os sinais de advertência

A partir da década de 50, surgiram novas classes de praguicidas que passariam a ocupar, nos anos seguintes, o lugar dos organoclorados, pois pesadas doses destes já não conseguiam controlar os insetos em diversas partes do mundo, configurando o que viria a ser chamado de **resistência**, salientado por inúmeros autores (THIERY et al, 1996; REGIS et al, 2000; POLANCZYK et al., 2003; MACORIS et al, 2003). Estudos posteriores demonstrariam que, em uma população natural, existem indivíduos cuja suscetibilidade a substâncias tóxicas varia em diferentes níveis. A continuidade do uso dos praguicidas seleciona os indivíduos mais tolerantes, promovendo o fracasso da ação tóxica do produto. Outro problema que começava a ser discutido era o da persistência dos organoclorados nos organismos vivos; descobriu-se que

estes praguicidas não eram metabolizados pelos animais, ficando acumulados por anos nos tecidos. Vestígios de DDT foram encontrados em animais que viviam em locais onde o produto nunca foi aplicado, como na região ártica, mostrando que o mesmo entra na cadeia alimentar, contaminando a fauna de maneira irreversível em curto prazo.

2.2.4 Em busca da modernidade

As pesquisas continuavam e novos compostos surgiam a cada ano. Na década de 70 nasciam os piretróides, produtos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir de substâncias vegetais. Estudavam-se também métodos de aplicação mais apropriados e uma política de uso racional dos praguicidas que respeitasse o ambiente. Foram desenvolvidos métodos e equipamentos específicos, bem como produtos que atendessem às exigências do uso urbano, onde se aplicam praguicidas em áreas fechadas freqüentadas por pessoas com altos níveis de suscetibilidade, como crianças e alérgicos. Os praguicidas urbanos tinham agora que atender a maiores exigências quanto à segurança e persistência no ambiente. As leis especificavam quais produtos poderiam ser aplicados nas cidades, exigindo-se na sua composição uma maior pureza dos componentes ativos e solventes diferentes dos usados na agricultura, já que estes eram específicos para aplicação em áreas abertas e ventiladas. Um fato interessante é que, apesar de parecer óbvio, apenas nos anos 70 passaram a ser adotadas práticas que visavam a preservar o ambiente e a saúde das pessoas expostas a praguicidas. Com todos estes aperfeiçoamentos e novos conceitos se popularizando, desponta nos consumidores, tendência à opção por empresas qualificadas, que fossem além da simples “pulverização de rodapés”. Surge, então, o termo DESINSETIZAÇÃO para designar o controle de insetos, iniciando-se uma nova era, na qual procura-se solucionar os problemas de maneira mais ampla, levando em conta outros fatores além do tamanho da área a ser tratada.

Atualmente, a OMS empenha-se em registrar a ocorrência de espécies resistentes e define metodologias para a sua detecção. A resistência, sendo um fator genético, é reversível e a suspensão de um produto por um determinado tempo recompõe a população atingida, que pode tornar-se novamente suscetível ao produto. Por tais razões, os praguicidas devem ser usados em suas menores concentrações letais e devem-se adotar medidas preventivas que dificultem o uso desnecessário. A resistência é definida como a capacidade de uma população superar o efeito tóxico de uma substância, geralmente letal a gerações precedentes. É uma característica hereditária apresentada apenas por populações já dotadas dos fatores de resistência e não, como se supunha no passado, por habitat ou por ação mutagênica (Superintendência de Controle de Endemias, 2004).

2.2.5 Classificação quanto à natureza química

Quimicamente, os praguicidas são classificados como compostos inorgânicos ou orgânicos.

INORGÂNICOS:

Embora conhecidos pelos povos gregos, romanos e chineses muitos séculos antes da nossa era, o uso moderno dos inseticidas data de 1867, quando um produto chamado verde-Paris foi preparado comercialmente e usado contra um grande número de pragas. Após essa data, outros produtos inorgânicos apareceram, como aqueles à base de bário, boro, flúor, antimônio, tálio, chumbo, cádmio, mercúrio, além da calda sulfocálcica e os óleos minerais. Como desvantagens, destacam-se sua acumulação nos tecidos orgânicos, estabilidade e longa persistência no ambiente por serem à base de metais. Possuem alta toxicidade e não têm antídotos. Sua importância reduziu-se bastante com o aparecimento dos praguicidas orgânicos; hoje não totalizam 10% dos produtos em uso.

ORGÂNICOS:

Os praguicidas orgânicos (denominados assim devido à presença do átomo de carbono na fórmula) constituem o grupo de maior importância. São divididos em SINTÉTICOS (compostos produzidos pelo homem) e NATURAIS.

A utilização pelo homem de compostos orgânicos naturais é remota. Os de origem vegetal constituem a maioria deste grupo, sendo os mais conhecidos os piretros, utilizados muito na antiguidade, obtidos a partir de macerado de flores de *Chrysantemum*, com ação nervosa paralisante reversível. Além dos compostos de origem vegetal, podem-se citar os de origem animal e os derivados do petróleo. A descoberta dos compostos orgânicos sintéticos possibilitou a geração de imensa gama de produtos orgânicos, classificados como organoclorados, clorofosforados, organofosforados, carbamatos, piretróides, dinitro compostos, cloronitrofenol, etc.

As características dos principais grupos químicos utilizados na área da Saúde, nas atividades de controle de vetores, estão indicadas nos Quadros 1, 2, 3 e 4.

Quadro 1 – Características gerais dos organoclorados. Fonte: SUCEN (2004)

| ORGANOCORADOS |
|---|
| <p>Constituem o grupo pioneiro dos praguicidas sintéticos. De largo uso agrícola e domiciliar, os organoclorados desempenharam papel marcante no combate a organismos nocivos ao homem, com repercussões sociais e econômicas importantes. Foram desenvolvidos durante a 2ª Guerra Mundial, para proteção contra malária, tifo exantemático e outras enfermidades transmitidas por insetos, bem como para o controle de enorme quantidade de espécies prejudiciais à lavoura, sendo considerados na época uma panacéia. Com o advento de legislações restritivas em muitos países, por sua persistência ambiental, tendência a acúmulo no organismo e o aumento da resistência dos insetos, diminuiu-se a sua utilização. No Brasil, o uso dos organoclorados é proibido para o uso agrícola, sendo somente autorizado para órgãos públicos responsáveis pelas Campanhas de Saúde (Portaria n.º 329 de 2/9/85 do Ministério da Agricultura), embora atualmente esteja também em desuso por estes últimos.</p> |
| <p>ESTRUTURA MOLECULAR: Corresponde a dos hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclohexeno.</p> |
| <p>PERSISTÊNCIA/DEGRADAÇÃO: Atualmente são muito criticados, dada a sua longa persistência no ambiente (até 30 anos no solo) e a acumulação nas cadeias alimentares. Devido à notável resistência ao ataque de microrganismos e à alta estabilidade de grande parte dos organoclorados à ação da luz solar e temperatura ambiente, não são degradados facilmente, o que leva à contaminação do meio, quebrando o equilíbrio biológico.</p> |
| <p>MODO DE AÇÃO: Atuam por ingestão e contato, bloqueando a transmissão dos impulsos nervosos.</p> |

Quadro 2 - Características gerais dos organofosforados. Fonte: SUCEN (2004).

| ORGANOFOSFORADOS |
|---|
| Desenvolvidos na década de 40, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade, como o temephos, que tem seu uso permitido em água potável. Na área da Saúde têm sido bastante usados, dada a sua eficiência. No entanto, este grupo é responsável por grande número de intoxicações e mortes no país. |
| ESTRUTURA MOLECULAR: São ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo (ácido fosfórico, ácido tiofosfórico, ácido ditiofosfórico e outros), contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Os organofosforados possuem vários grupos segundo sua estrutura, estando entre os mais numerosos os fosfatos (diclorvos), fosforotioatos (fenitrothion, temephos) e fosforoditioatos (malathion, dimetoato). |
| PERSISTÊNCIA/DEGRADAÇÃO: São biodegradáveis, sendo, portanto sua persistência curta no solo, 1 a 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente parece ser a hidrólise sob condições de alcalinidade. Muitos inseticidas organofosforados são instáveis em pH menor que 2, sendo a maioria mais estável na faixa de pH do ambiente (pH 3-6). É importante que estes compostos sejam estáveis em pH neutro, por causa de suas formulações em óleos concentrados, solventes miscíveis em água, grânulos inertes, para aplicação direta ou após dispersão em água. Em algumas circunstâncias do processo de oxidação de fosforotioatos, por serem mais voláteis e tóxicos, podem transformar-se em fosfatos, resultando em composto potencialmente perigoso. Isto pode ocorrer quando os praguicidas são armazenados sob altas temperaturas. Também, uma isomerização associada com perigo tóxico tem sido observada durante a estocagem de algumas formulações de malathion, particularmente sob condições climáticas quentes e úmidas, tornando-o notavelmente potencializado. |
| MODO DE AÇÃO: O modo de ação é por contato e ingestão. Agem como inibidores das enzimas colinesterases, causando o aumento dos impulsos nervosos, assim podendo ocasionar a morte. |

Quadro 3 - Características gerais dos carbamatos. Fonte: SUCEN (2004).

| CARBAMATOS |
|--|
| Os primeiros carbamatos foram postos no mercado por volta de 1950. Apresentam um pequeno espectro de atividade inseticida. |
| ESTRUTURA MOLECULAR: São praguicidas orgânicos derivados do ácido carbâmico. Três classes de carbamatos são conhecidos: carbamatos inseticidas (e nematicidas), carbamatos herbicidas e carbamatos fungicidas. Os carbamatos usados como inseticidas (e nematicidas) são derivados do éster de ácido carbâmico. |
| PERSISTÊNCIA/DEGRADAÇÃO: Em geral, são compostos instáveis. Muitos fatores influenciam a degradação dos carbamatos, como a umidade, temperatura, luz, volatilidade. Carbamatos são metabolizados por microrganismos, plantas e animais ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino. Ocorre decomposição com a formação de amônia, amina, dióxido de carbono, fenol e álcoois. |
| MODO DE AÇÃO: Com ação de contato e ingestão, são igualmente inibidores das enzimas colinesterases, embora por mecanismo diferente dos organofosforados. |

Quadro 4- Características gerais dos piretróides. Fonte: SUCEN (2004).

| PIRETRÓIDES |
|---|
| Os piretróides foram descobertos a partir de estudos que procuravam modificar a estrutura química das piretrinas naturais, e, uma vez que apresentavam maior capacidade letal para os insetos, propriedades físicas e químicas muito superiores, maior estabilidade à luz e calor e menor volatilidade, despertaram o interesse dos cientistas. |
| Foram introduzidos no mercado em 1976 e ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros praguicidas, os piretróides têm sido bastante empregados na área da Saúde e na Agricultura. Isto ocorre devido à alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. Com isso, vêm tomando rapidamente o lugar dos organofosforados. Outra vantagem destes praguicidas é que eles admitem a sinergia, ou seja, a potencialização pela adição de um sinergista, dando lugar a um aumento da eficácia. Geralmente seguros para mamíferos, algumas substâncias tem alto "knockdown", com boa mortalidade. |
| ESTRUTURA MOLECULAR: São compostos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo. |
| PERSISTÊNCIA/DEGRADAÇÃO: Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente, não se registrando acumulação de resíduos ou esta alcança níveis não detectáveis. |
| MODO DE AÇÃO: São os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos. Podem possuir efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los. |

2.2.6 Formulação

Normalmente o **ingrediente ativo** (ia) ou princípio ativo (composto químico destinado a debelar a praga) isoladamente não é apropriado para aplicação direta no ambiente. O praguicida necessita estar em **formulação**, forma conveniente para uso efetivo e seguro. A formulação permite mesclar o produto de grau técnico com elementos inertes, sólidos ou líquidos (como óleo, água e outros solventes, pós ou outros adjuvantes e aditivos), de modo que tenha a concentração adequada, facilitando, assim, a sua manipulação, aplicação e transporte, bem como a dispersão, para um melhor desempenho sobre o vetor da doença ou praga a ser controlada. Existem diversos tipos de formulações no comércio, inclusive produtos de formulações diferentes com o mesmo ingrediente ativo. Nas operações de controle químico, emprega-se grande variedade de praguicidas, sendo a escolha dos princípios ativos, respectivas formulações e concentrações, baseada na espécie a ser combatida, sua susceptibilidade ao produto, fase alvo do ciclo de vida, forma de aplicação, equipamentos

envolvidos, eficácia dos produtos, relação custo/benefício, risco para a população humana e impacto no ambiente. O importante é que o praguicida selecionado tenha toxicidade baixa para os mamíferos e alta para os organismos alvos (Superintendência de Controle de Endemias, 2004).

2.2.7 Principais praguicidas utilizados no controle de vetores e hospedeiros intermediários no Estado de São Paulo

Os principais praguicidas utilizados atualmente na área da Saúde estão indicados no Quadro 5. Para a identificação de uma formulação há uma maneira padronizada para a indicação do nome comercial, a concentração do ingrediente ativo e o tipo de formulação. Menciona-se em primeiro lugar o nome comercial do praguicida, seguido pela proporção (em porcentagem) em que participa o ingrediente ativo e as iniciais que indicam o tipo de formulação. Ex.: XXX 20 CE. Indica que se trata de um concentrado emulsionável que contém 20 gramas de ingrediente ativo em cada 100 mL de formulação preparada (20 % m/v). A concentração dos praguicidas também é indicada pela quantidade em gramas do ingrediente ativo contida em cada litro de formulação. Ex.: XXX 500 E. Apresenta 500 gramas de ingrediente ativo em cada litro de formulação, que misturados em água irão produzir uma emulsão (500 g/L). Dessa forma, para conhecer a concentração do princípio ativo numa determinada formulação, é necessário verificar sua composição no rótulo. É importante ressaltar que a concentração deste em uma formulação comercial é diferente da concentração final da calda que será aplicada no campo.

Quadro 5 – Quadro sinóptico dos praguicidas utilizados atualmente no controle de vetores e hospedeiros intermediários no Estado de São Paulo. Fonte: SUCEN (2004).

| TIPO DE PRAGUICIDA | GRUPO QUÍMICO | INGREDIENTE ATIVO | FORMULAÇÃO | CONCENTRAÇÃO DO ia | CLASSE TOXICO LÓGICA | ORGANISMO ALVO (1) | MODO DE AÇÃO | FORMA DE APLICAÇÃO |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------------------|--|----------------------------|---|
| Inseticida | Organo fosforado | Fenitroion | Pó Molhável | 40% | III | <i>Aedes</i> (adulticida, larvicida) | Contato | Pulverização de superfícies |
| | | Malation | Grau técnico (UBV) | 93% a 96% | III | <i>Aedes</i> (adulticida) | Contato | Nebulização |
| | | Temefos(2) | Granulado | 1% | III | <i>Aedes</i> (larvicida) | Ingestão | Lançamento |
| | Piretróide | Cipermetrina | Concentrado Emulsionável | 20% 25% | II | <i>Aedes</i> (adulticida) | Contato | Nebulização |
| | | | Pó molhável | 40% | III | Triatômicos, Anofelinos, Flebotômicos | Contato | Pulverização de superfícies |
| | | Deltametrina | Concentrado Emulsionável | 2,5% | III | Triatômicos, Anofelinos, Flebotômicos, <i>Aedes</i> (adulticida) | Contato | Pulverização de superfícies e Nebulização |
| | | | Suspensão Concentrada | 2,5% 5% | III | Triatômicos (adulticida) | Contato | Pulverização de superfícies |
| Biológico | <i>Bacillus thuringiensis</i> | Suspensão Aquosa | 1,6% | IV | Simulídeos, Culicídeos (larvicida) | Ingestão | Gotejamento e Pulverização | |
| Moluscicida | | Sal de niclosamida etanolamina | Pó Molhável | 70% | III | Planorbídeos | Contato | Pulverização de coleções hídricas |

2.2.8 Toxicidade

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.

No Quadro 6, estão representados os principais efeitos tóxicos dos praguicidas comumente utilizados para o controle de vetores.

Quadro 6 – Efeitos tóxicos provocados pelos praguicidas utilizados na área da Saúde. Fonte: SUCEN

| |
|--|
| <p>ORGANOCLORADOS: Apresentam, dentre outros, efeito cancerígeno, mutagênico e neurotóxico. Nos casos agudos, atuam no sistema nervoso central (SNC), impedindo a transmissão nervosa normal, resultando em alterações do comportamento, do equilíbrio, da atividade da musculatura involuntária, distúrbios sensoriais e depressão dos centros vitais, particularmente da respiração (afetam o equilíbrio sódio/potássio). Tem ação estimulante sobre as enzimas metabolizantes de drogas. Ao penetrarem no organismo, têm efeito cumulativo e concentram-se nos tecidos adiposos, especialmente no abdômen, cérebro e fígado. A eliminação se faz pela urina, cabendo destacar também a eliminação pelo leite materno.</p> |
| <p>ORGANOFOSFORADOS: Ao penetrarem no organismo, os organofosforados não são acumulados nos tecidos, sendo facilmente degradados e excretados pela urina. No entanto, a toxicidade aguda é importante para os mamíferos. Todos os organofosforados agem como inibidores da enzima colinesterase, impedindo a atuação desta sobre a acetilcolina, provocando sérias conseqüências nos organismos animais. Os efeitos tóxicos dos organofosforados são devido ao grande acúmulo da acetilcolina nas terminações nervosas. A acetilcolina é um importante transmissor de impulsos nervosos, ou neurotransmissor. Em condições normais, o organismo a destrói, pela ação da colinesterase, quase instantaneamente à medida que ela vai sendo liberada, dando origem à colina e ácido acético. Uma vez em excesso, é intensamente prejudicial, já que o funcionamento de glândulas, músculos e do sistema nervoso (inclusive o cérebro) é alterado.</p> |
| <p>CARBAMATOS: A principal forma de intoxicação de pessoas que tem contato excessivo com este praguicida é pela inibição da enzima colinesterase, de modo muito parecido com os praguicidas organofosforados. Este processo, no entanto, tem a diferença de não ser estável, ser geralmente reversível e muito mais rápido que no caso dos organofosforados.</p> <p>Trabalhos experimentais mostraram que os carbamatos apresentam a dose eficaz mediana, ou dose que produz sinais clínicos em 50% dos animais de experiência, bem mais afastada da dose letal 50% (DL 50) do que os organofosforados. Com isso, embora as intoxicações possam ser igualmente graves, quando surgem os primeiros sintomas de intoxicação, a dose absorvida está bastante longe da dose letal, o que torna os carbamatos menos perigosos. A recuperação começa em pouco tempo já que estes são rapidamente metabolizados pelos organismos humanos e eliminados pela urina, não se acumulando no organismo.</p> <p>Os praguicidas carbamatos possuem, além da inibição reversível da acetilcolinesterase, outros efeitos bioquímicos e farmacológicos, incluindo um decréscimo de atividade metabólica do fígado, alterações dos níveis de serotonina no sangue e um decréscimo da atividade da glândula tireóide.</p> |
| <p>PIRETRÓIDES: Os piretróides sintéticos atuam no sistema nervoso central e periférico, interagindo com os canais de sódio, tanto nos mamíferos quanto nos insetos. Em doses muito altas, despolarizam completamente a membrana da célula nervosa e bloqueiam a excitabilidade, podendo produzir danos permanentes ou durante um longo tempo nos nervos periféricos. Nas provas de laboratório, verifica-se que os piretróides sintéticos são bastante tóxicos para peixes e artrópodes aquáticos, assim como para as abelhas, porém na prática os efeitos adversos são pequenos. Para pássaros, a toxicidade destes praguicidas é baixa.</p> <p>Os piretróides sintéticos são geralmente metabolizados no organismo dos mamíferos e excretados, não se acumulando nos tecidos.</p> |

Ainda com relação à toxicidade, Cavaliere et al. (1996), estudando a miotoxicidade por organofosforados, salientam que a principal causa de morbidade e mortalidade nas intoxicações provocadas por eles é o comprometimento cardiorrespiratório. No entanto, o comprometimento da musculatura esquelética, sobretudo da musculatura respiratória contribui para tal morbidade.

TEIXEIRA et al. (2003), evidenciaram que o uso dos inseticidas organofosforados e piretróides pode ser responsável pela ocorrência da perda auditiva periférica.

2.2.9 Dados toxicológicos agudos

A toxicidade aguda (produzida por dose única e excessiva, por qualquer via de absorção) é a maneira mais comum de expressar o poder letal de uma substância ou composto químico, sendo geralmente expressa como dose letal média (DL_{50}) e concentração letal mediana (CL_{50}). Em geral, quanto mais alta é a DL_{50} ou CL_{50} de um determinado praguicida, menor será o risco de intoxicação*. O animal eleito para este teste é o rato.

2.3 Situação atual da dengue no Brasil e no Estado de São Paulo

A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) registrou, até a semana epidemiológica 16, de 2004[†], 31658 casos, no Brasil. Quando são comparados os dados do primeiro trimestre do ano (30967) com os do mesmo período em 2003, observa-se uma redução de 81,8% no número de casos (Figura 2 e Tabela 1). Há circulação autóctone dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus[‡] em 23 unidades federadas (Figura 3). Foram confirmados 9 casos de Febre Hemorrágica da Dengue, com um óbito registrado no Estado de Minas Gerais.

* A CL_{50} é também um parâmetro utilizado para verificar a qualidade de um produto microbiano e corresponde à concentração letal esperada que causa 50% de mortalidade em larvas.

[†] A semana epidemiológica 16 compreende o período de 18 a 24/04/2004.

[‡] Uma segunda infecção, causada por um sorotipo diferente pode desencadear a Febre Hemorrágica da Dengue.

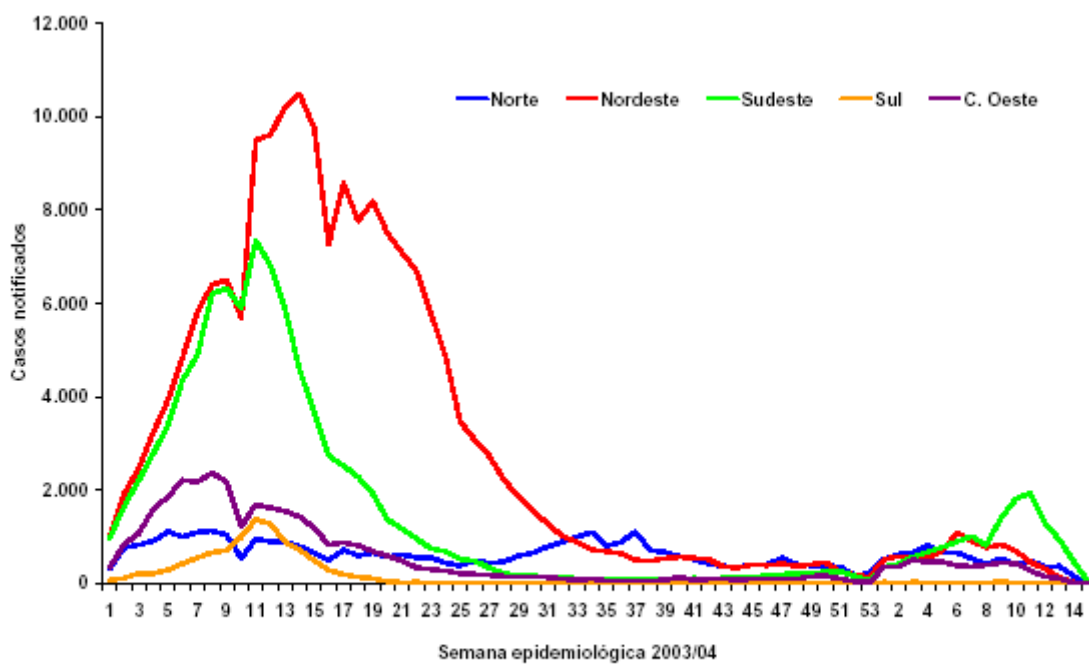


Figura 2 – Casos notificados de dengue por semana epidemiológica segundo região, Brasil, 2003-2004*.

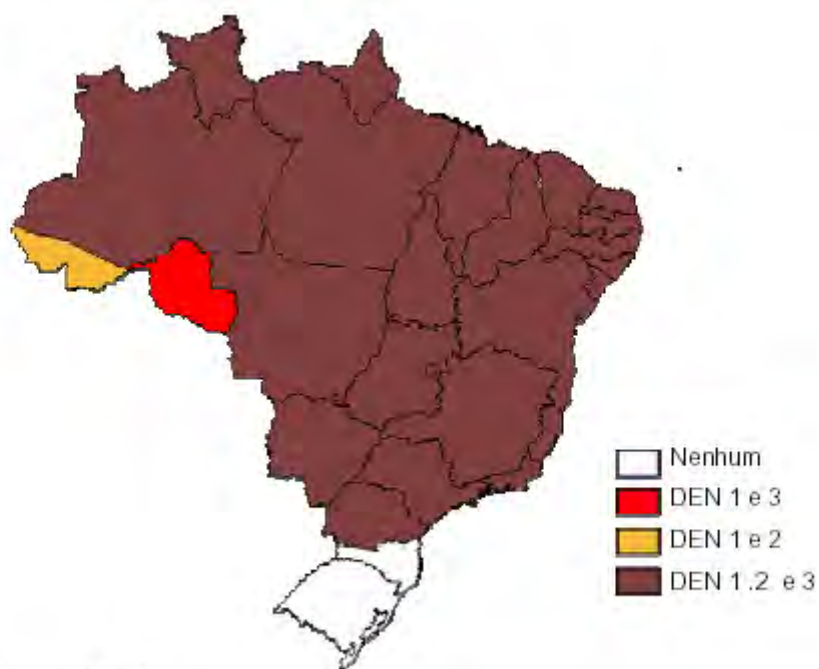
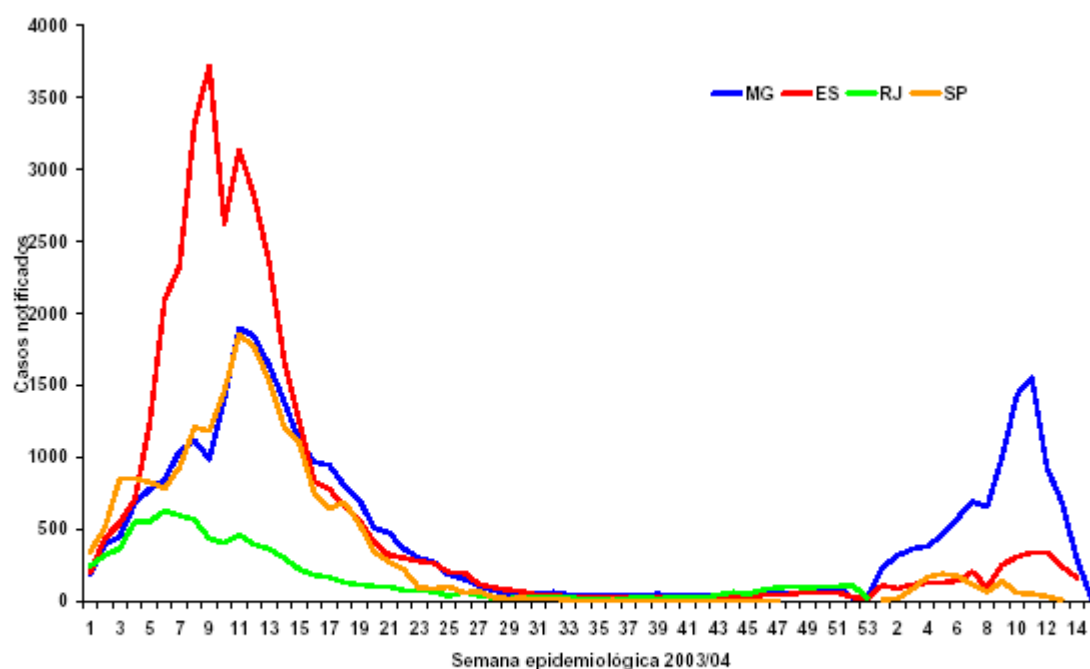


Figura 3 – Sorotipos circulantes do vírus da dengue por Estados, Brasil, 2003*.

Região Sudeste

A região Sudeste apresentou um total de 13751 casos da doença, sendo 13281 no primeiro trimestre. Esse valor representa uma redução de 77,6% quando se compara ao mesmo período de 2003. O Estado de Minas Gerais apresenta o maior número de casos, com 9587 casos. No Estado de São Paulo, o município de Potim apresenta até o momento, 548 casos confirmados.



Fonte: Secretarias de Estado da Saúde

*Dados preliminares. Informações do número de casos de acordo com a semana epidemiológica não foram repassadas pela Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, estando disponíveis apenas os dados mensais.

Figura 4 – Casos notificados de dengue por semana epidemiológica, região sudeste, 2003*.

Tabela 1 – Casos notificados de dengue clássico por região e unidade federada (UF) de residência nos meses de janeiro a março, Brasil, 2003-2004.

| REGIÃO/UF | 2003 | 2004 | Diferença (%) |
|---------------------|---------|--------|---------------|
| Brasil | 170.479 | 30.967 | -81,84 |
| Norte | 16.784 | 6.997 | -58,31 |
| RO | 3.123 | 1.339 | -57,12 |
| AC | 834 | 417 | -50,00 |
| AM | 1.850 | 321 | -82,65 |
| RR | 912 | 305 | -66,56 |
| PA | 7.512 | 3.015 | -59,86 |
| AP | 815 | 1.071 | 31,41 |
| TO | 1.738 | 529 | -69,56 |
| Nordeste | 65.212 | 6.394 | -90,20 |
| MA | 6.481 | 95 | -98,53 |
| PI | 3.822 | 269 | -92,96 |
| CE ⁽¹⁾ | 7.919 | 650 | -91,79 |
| RN | 6.462 | 641 | -90,08 |
| PB | 4.841 | 889 | -81,64 |
| PE | 9.517 | 2.200 | -76,88 |
| AL | 1.405 | 514 | -63,42 |
| SE | 2.494 | 325 | -86,97 |
| BA | 22.271 | 811 | -96,36 |
| Sudeste | 59.347 | 13.281 | -77,62 |
| MG | 13.859 | 9.280 | -33,04 |
| ES | 25.519 | 2.472 | -90,31 |
| RJ | 5.876 | 579 | -90,15 |
| SP ⁽²⁾ | 14.093 | 950 | -93,26 |
| Sul | 7.704 | 159 | -97,94 |
| PR | 7.341 | 33 | -99,55 |
| SC | 194 | 88 | -54,64 |
| RS | 169 | 38 | -77,51 |
| Centro Oeste | 21.432 | 4.136 | -80,70 |
| MS | 3.763 | 872 | -76,83 |
| MT | 9.574 | 621 | -93,51 |
| GO | 6.797 | 2.237 | -67,09 |
| DF | 1.298 | 406 | -68,72 |

1. Casos confirmados.
2. Casos confirmados autóctones.

O Estado de São Paulo, mais precisamente a região de São José do Rio Preto, a qual compreende 101 municípios, tem apresentado epidemias de dengue desde 1991 e o número de casos vem oscilando nos últimos anos, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Número de casos de dengue na região de São José do Rio Preto - SP

| ANO | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004* |
|-------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Nº de casos | 1184 | 4793 | 1096 | 9648 | 1872 | 1097 | 65 |

Fonte: SUCEN

* Informação até o dia 28/05/2004.

Em trabalho de monitoramento realizado pela Superintendência de Controles de Endemias (SUCEN), pretendeu-se verificar o grau de eficácia do inseticida atualmente utilizado, através de 150 armadilhas ovitrampas, espalhadas no município. Nestas armadilhas, as fêmeas dos mosquitos colocam seus ovos. Estes são encaminhados para a SUCEN de Marília que é a única que realiza o monitoramento e os exames com relação à resistência dos mosquitos aos inseticidas usados pelas 10 superintendências do Estado - São Paulo, São Vicente, Taubaté, Sorocaba, Campinas, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto, Araçatuba, Presidente Prudente e Marília. Com o monitoramento é possível descobrir se o veneno aplicado nos municípios ainda surte efeito no combate ao *Aedes*. No laboratório de Marília os ovos recolhidos nas 10 cidades são conservados para que se tornem adultos. Nessa fase, são alimentados com sangue de camundongos. A análise da resistência ocorre logo após o nascimento das larvas. Os pesquisadores deixam que algumas virem mosquitos, para também testar o inseticida na fase adulta dos insetos. Em algumas regiões do Estado os mosquitos são mais resistentes que em outras. Em São José do Rio Preto já foi detectada a ineficácia do inseticida cipermetrina. Esse veneno foi usado até o final de 2001, quando o laboratório diagnosticou, por meio das armadilhas, a imunidade dos mosquitos à substância. No início de 2002, o combate ao mosquito passou a ser feito com um organofosforado. A resistência dos insetos transmissores da dengue a determinadas substâncias dura em média cinco anos, ao final do qual pode haver necessidade de trocar a substância correntemente em uso (ASCARI, 2003).

Com base nestas afirmações e de acordo com o Plano Nacional de Controle da Dengue, que pressupõe a mudança na metodologia de controle nos casos de resistência, pode-se, então, a médio e longo prazo, tornar-se importante a adoção de medidas alternativas de controle do vetor *Ae. aegypti*, que atualmente resumem-se ao controle mecânico e químico.

2.4 Controle biológico

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.

BECKER e MARGALIT, 1993; MARGALIT, 1996 apud ARRUDA, 1999, afirmam que a descoberta do *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*), em 1976, inaugurou um novo capítulo no controle de vetores. Esse novo isolado foi caracterizado como H-14 e é efetivo sobre larvas de mosquitos.

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. As espécies do gênero *Bacillus* são representadas por células em forma de bastonete, às vezes em cadeia, a maioria capaz de produzir endósporo. Uma das características bacteriológicas típicas de *Bt* é a formação de esporos entre elípticos e cilíndricos, em posição central, com um esporângio não nitidamente estendido. A célula bacteriana é um bastonete de 1 a 1,2 por 3 a 5 μ , geralmente com motilidade. É aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose. Apresenta como característica típica a presença de um cristal protéico intracelular (HABIB; ANDRADE apud ALVES, 1998). A Foto 1 representa um esporângio de *Bti* visto em microscopia eletrônica de transmissão.

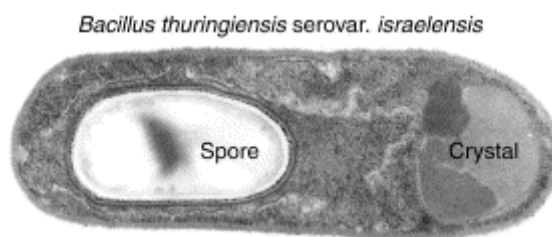


Foto 1 – Esporângio de *Bti* antes do final do processo de esporulação, visualizado por microscopia eletrônica. Fonte: Regis et al. (2001).

O *Bti* apresenta uma potência biológica alta quando comparado aos inseticidas químicos. De acordo com o manual de normas técnicas sobre a dengue, enquanto o produto organofosforado temefós é utilizado na proporção de 1 grama para 10 litros de água, para o produto à base de *Bti* é utilizada a proporção de 1 grama para 50 litros de água (Fundação Nacional de Saúde, 2001). Devido também ao seu modo de ação, o *Bti* é mais específico e portanto mais seguro para a fauna não-alvo e para o homem. A grande atividade inseticida deve-se às proteinases tóxicas situadas em corpos paraesporais (cristais). Eles são produzidos no segundo estágio da esporulação. Após a ingestão, os cristais são dissolvidos em meio alcalino do intestino médio e as protoxinas (não exibem atividade biológica e ativação proteolítica necessária) são liberadas. As proteases do intestino desdobram as protoxinas e produzem uma proteína ativada de menor tamanho. Esta toxina tem que passar pela membrana peritrófica para ser reconhecida por receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais do intestino médio. Após a ligação com o receptor, a toxina cria poros que interferem no sistema de transporte de íons pela membrana do tecido. Esse processo causa lise do epitélio do intestino médio e/ou interrompe a secreção normal, baixando o pH do lúmen, favorecendo a germinação dos esporos que acarretará na septicemia e morte do inseto (GLARE; O' CALLAGHAM, 2000).

Na Figura 5, pode-se observar o modo de ação da toxina.

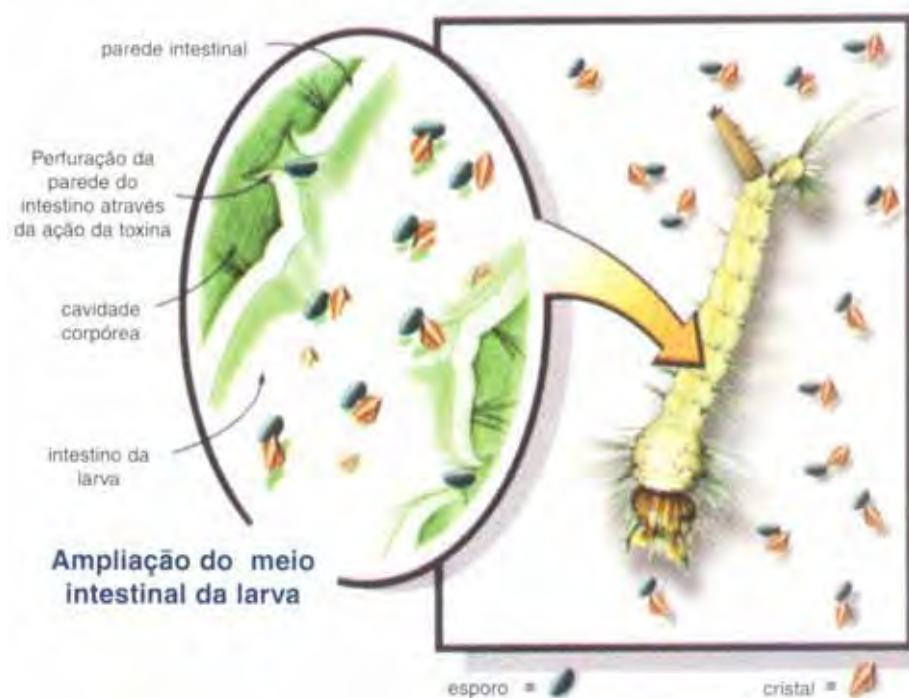


Figura 5 – Modo de ação da toxina *

2.5 Produção do bioinseticida

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. Sendo assim, as amostras dos experimentos com diferentes níveis de oxigênio dissolvidos foram testados contra *Ae. aegypti*. A análise de toxicidade mostrou claramente que a taxa ótima está dentro de O=20-30%. Salientam ainda que, o efeito do oxigênio na toxicidade pode ser mais complexo, embora tenha sido confirmado que níveis altos de oxigênio resultam em uma redução significativa na toxicidade. Os dados experimentais indicam que o oxigênio, o açúcar, os produtos de inibição e componentes indeterminados influenciam a taxa de crescimento. A proteína é a principal fonte de energia e necessidades metabólicas; entretanto, uma fonte de

* Extraído do manual de aplicação do larvicida Vectobac, produto registrado da Valent Biosciences Corporation.

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 a medida que o microrganismo inicia a esporulação.

Estudando crescimento e toxicidade de *Bti* H-14, Desai e Shethna (1989), utilizaram meios quimicamente definidos contendo ácido glutâmico, glutamina e ácido aspártico em uma concentração de 20 mM cada um. Cada um destes meios permitiu crescimento abundante e esporulação de *Bti*. Os cristais paraesporais produzidos nestes meios foram tóxicos à larva de quarto instar de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. O meio contendo 20 mM de glutamina induziu prévia esporulação de *Bti*. Foi obtido um valor de DL_{50} (dose letal média) de 3,92 $\mu\text{g/L}$. Formulações imobilizadas de *Bti* em alginato de cálcio e Agar agar exibiram toxicidade de 90 % e acima deste valor para larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, em um período superior a 90 dias.

Costa et al. (1991) afirmam que a atividade larvicida do *Bti* está associada à endotoxina localizada predominantemente nas inclusões paraesporais e que manifesta sua atividade patogênica quando ingerida pela larva do vetor. A definição das estratégias de emprego do *Bti* depende do habitat dos mosquitos, interferindo na escolha das formulações e doses a serem usadas. As formulações que possam flutuar à superfície da água tem maior chance de eficiência. A profundidade dos focos de proliferação deve ser considerada nos cálculos de dose a ser usada.

2.6 Resíduos ou sub-produtos agroindustriais

O alto custo para produção do bioinseticida tem promovido variadas pesquisas com relação ao desenvolvimento do meio de cultura, no qual resíduos da agro-indústria e agropecuária de geração local contribuiriam para amenizar esta questão.

Ejiofor e Okafor (1991) estudaram uma formulação econômica do *Bti* para países em desenvolvimento, usando mandioca, melão, óleo de palma e carvão. Realizaram bioensaios em larvas de *Ae. aegypti* no 4º ínstar.

Abdel-Hameed et al. (1990) objetivaram estudar ingredientes para fermentação que fossem de baixo custo, próximos à localidade onde o trabalho estava em desenvolvimento e de composição satisfatória (rico em nutrientes) para a produção da δ -endotoxina, utilizada no controle biológico de mosquitos no Egito, usando isolados locais de *Bt* H-14. Os bioensaios foram executados com o mosquito *Culex pipiens*. Sendo assim, utilizaram grãos como a soja, feijão preto, ervilhas e lentilhas, os quais proporcionaram boa produção em oposição a outras substâncias, tais como amendoim, levedura alimentar, soro de queijo e xarope de milho que proporcionaram pequenas quantidades da toxina. Melão, como única fonte de carbono nas concentrações de 2 e 3 % (p/v) com soja (ou “Proflo”) como a única fonte de nitrogênio, na concentração de 3%, proporcionou o melhor rendimento de toxina para as linhagens M1 e S128, respectivamente.

O mesmo grupo de pesquisa, em 1991, trabalhando com a caracterização das condições de fermentação para a produção da δ -endotoxina, formulou um meio de fermentação a partir de ingredientes locais de baixo custo e de alto teor nutritivo, tais como farinha de soja, “Proflo” (farinha de semente de algodão parcialmente cozida e desengordurada) e melões, utilizando-se de um fermentador de 8 litros. Os bioensaios foram realizados com *Culex pipiens*. Um bom crescimento e esporulação foram obtidos com todas as combinações de meio de cultura

testadas, mas um meio composto de 3% (p/v) de farinha de soja e 1% (p/v) de melão foi o melhor para a produção da δ -endotoxina. As condições ótimas para cultivo em batelada com respeito à aeração (0,37 a 0,62 vol./vol. min⁻¹), agitação (200 revol./min), pH (6,6 a 7,5), temperatura (30°C) e a concentração inicial das fontes de carbono (1% p/v) e nitrogênio (3% p/v) foram averiguadas. A pesquisa demonstrou que os ingredientes que estão disponíveis localmente em grandes quantidades podem ser utilizados para a produção de larvicidas a baixo custo no Egito e outros países em desenvolvimento onde estes ingredientes são acessíveis.

Lee e Seleena (1991) destacaram a urgente necessidade da utilização de resíduos localmente acessíveis e de baixo custo, através da tecnologia de fermentações, para a produção de *Bti*, altamente eficaz no controle de mosquitos vetores de doenças. Os estudos de fermentação em frascos agitados contendo caldo nutriente e resíduo de soja, respectivamente, indicaram um tempo de 37 horas para que um isolado de *Bti* H-14 da Malásia produzisse a endotoxina. Em resíduo de coco ralado, farinha de peixe e farelo de arroz, a bactéria levou 28 horas, 26 horas e 126 horas respectivamente para produzir a endotoxina. A endotoxina foi obtida do caldo nutriente padrão após 55 horas e após 50 horas no meio de soja, resíduo de coco ralado e farinha de peixe. No meio de farelo de arroz, a endotoxina foi obtida somente após 150 horas após a inoculação. Entretanto, nenhum crescimento bacteriano foi detectado em efluente de óleo de coco. Em termos de produção de endotoxina e biomassa, a farinha de peixe pareceu ser um meio de cultura apropriado. Além do trabalho experimental, foi realizada uma breve revisão bibliográfica dos resíduos utilizados em vários países para a produção do *Bti*. Assim, nos países do sudeste asiático, utilizou-se a farinha de "mugbean" como um meio de cultura para a produção em pequena escala de *Bt* sorotipo H-8. Na Tailândia, destacou-se o uso de um meio, para produção de *Bt* H-14, obtido do subproduto do glutamato monossódico produzido industrialmente. Na China, a produção de *Bt* em larga

escala foi conduzida utilizando-se resíduos locais tais como misturas de farinha de trigo e fubá, amendoim com levedura e casca da pupa do bicho-da-seda. Resíduos brutos, tais como o açúcar mascavo, também foram usados na Índia.

Ernandes (1998) estudando o desenvolvimento de *Bt* em resíduos da agroindústria e pecuária, incluiu o sangue de ave e de suínos como meios de cultura promissores para a produção de bioinseticidas a partir de *Bt*. Os experimentos mostraram que a esterilização do sangue reduz o pH inicial do meio de cultura a níveis incompatíveis com o crescimento bacteriano e o meio de cultura não esterilizado apresentou bom crescimento do microrganismo, com a conseqüente esporulação e formação de cristais. Foram acompanhados o comportamento do pH e do consumo de açúcar, bem como por microscopia o aparecimento de cristais e esporos. Os resultados obtidos permitiram concluir que o sangue de aves especialmente, por permitir crescimento e esporulação mais rápidos, mas também o de suínos, que se constituem resíduos abundantes e poluentes, podem ser utilizados com vantagens para a produção de biopesticidas de *Bt*.

Hyun et al. (1998) verificaram a eficácia da utilização de plasma bovino advindo de abatedouros para a produção econômica de probióticos. Substituíram um meio complexo de nitrogênio por um hidrolisado enzimático de plasma sanguíneo, com rendimento de 74% de biomassa quando comparado ao meio complexo comercial.

2.7 Efetividade do *Bti* no controle de pragas

Ventura et al. (1990), durante o ano de 1989, avaliaram a eficiência de *Bti* (E 153) e do fungo *Metarrhizium anisopliae* (E9) produzidos no laboratório da EMCAPA (Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária – Espírito Santo), observando que houve uma redução de

93-100% do número de larvas de moscas e que a produção de adultos foi reduzida em média de 63-96%, nas condições de ecossistema testado.

Lacey e Lacey (1981), realizando bioensaios com *Bti* (H-14), na forma de dois preparados, (IPS-78) formulados e preparados por de Barjac e o pó primário R-153.78 (produzido por Roger Bellon – grupo Biochem, França), em larvas de *Culex quinquefasciatus* e outros mosquitos da Amazônia Central, observou que o pó primário foi significativamente mais eficaz comparado à formulação padronizada diluída (IPS-78). De qualquer forma, os resultados deste trabalho indicam que este patógeno proporciona um meio de controle alternativo a uma grande variedade de espécies de culicídeos, especialmente onde os métodos culturais não são práticos e os meios químicos são indesejáveis. Em adição à alta eficácia desta variedade, suas outras vantagens são numerosas: cresce *in vitro*, eliminando a manutenção de animais hospedeiros experimentais, o que é um obstáculo para a maioria dos fungos e todos os vírus, microsporídeos e outros patógenos e parasitas de dípteros; pode ser estocado por longos períodos de tempo na forma de pó e a toxicidade aos mamíferos e efeitos em organismos não alvo são mínimos ou inexistentes. Ressalta, ainda, que pesquisas adicionais no sentido de aumentar a potência dos procedimentos e meios de fermentação podem garantir atividades larvicidas até mesmo maiores do que as duas preparações avaliadas neste estudo.

Ruas-Neto e Oliveira (1985) em estudos de atualização de conhecimentos sobre a importante questão da alternativa biológica no controle de pragas em Saúde Pública, destacam a importância do *Bti*, de alta atividade larvicida para simulídeos e culicídeos de vários gêneros. No caso dos culicídeos, constataram a ação larvicida na maioria das espécies de interesse médico-veterinário, incluindo os gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*. As concentrações letais de *Bti* conseguidas em laboratório em termos de DL_{50} ou DL_{100} , variaram de 0,01 a 0,1 ppm de culturas e 0,1 a 1 ppm de pós-primários ou formulações. A maioria dos

trabalhos indicou mortalidade elevada (DL₉₀ ou DL₁₀₀) com concentrações de 0,5 a 2 kg/ha, com pós-primários ou formulações. O efeito via de regra é menor nas larvas de 4º instar. Mencionam o fato de que, no Brasil, os fatores de resistência e impacto ambiental já tem levado a alguma preocupação no sentido da substituição dos larvicidas químicos, que atualmente têm sido quase que exclusivamente usados nos programas de utilização de larvicidas, na tentativa de controle de espécies vetoradas ou picadoras alergizantes como as de *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* (especialmente *Ae. aegypti*) e *Mansonia*. Ainda relacionado ao anteriormente exposto, dizem que a possibilidade de produção local de inseticidas bacterianos reduziria consideravelmente o custo do processo, além de proporcionar novas linhas de pesquisa e tecnologia nos aspectos do cultivo, fermentação e formulação dos produtos, bem como do isolamento de novas cepas melhor adaptadas às necessidades nacionais.

Ruas-Neto et al. (1994), estudando o controle de mosquitos no Rio Grande do Sul com base em larvicidas químicos e biológicos, constataram, em bioensaios de laboratório contra *Culex quinquefasciatus*, que as formulações biológicas líquidas Vectobac 12 AS e Teknar 3000 (*Bti*), foram altamente eficazes. Também as formulações experimentais de *Bti* produzidas em laboratório foram consideradas adequadas. Entre as formulações químicas, os compostos piretróides Pirisa e K-Othrine produziram resultados melhores do que os organofosforados Lebaycid e Abate. Em ensaios de campo, a dose de 1250 mg/m² para as formulações biológicas foi considerada adequada para a rotina das aplicações, porque permitiu superar as influências físicas do meio sobre os resultados. O estudo sugere que as alternativas biológicas devem ser consideradas em programas de controle de mosquitos. Elas podem superar os problemas de resistência e eliminação de inimigos naturais no meio aquático, bem como da ausência de efeito residual nas aplicações de larvicidas.

Montero Lago et al. (1985), obtiveram como resultado, em estudo comparativo da eficácia do *Bti* nas espécies de mosquito *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em condições de

laboratório, que a espécie *Ae. aegypti* apresentou uma alta susceptibilidade à bactéria, já que 100% das larvas morreram em 60 minutos usando 0,4 mg/l e em 2:30 horas usando 0,2 mg/l. Para *Culex quinquefasciatus*, a mortalidade foi de 100% depois de 4 horas com doses de 0,4 mg/l e depois de 8 horas com doses de 0,2 mg/l.

Montero Lago et al. (1986), trabalhando com a dose de 0,4 g/m² de *Bti*, em 6 criadouros naturais de mosquitos com diferentes características bioecológicas das espécies *Culex quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *Anopheles albimanus* e *Psorophora confinnis*, nas cidades de Havana e Santiago de Cuba obteve como resultado uma alta eficácia do bioinseticida, com a morte de 100% das larvas depois de transcorridas 24 horas de sua aplicação, assim como a inocuidade para outros seres vivos aquáticos. Foi confirmada, então, as vantagens e possibilidades de utilização deste método para a luta contra as espécies de mosquitos de importância médico-veterinária, em condições tropicais.

Suarez et al. (1987), ao avaliar em laboratório e em condições naturais, duas formulações de *Bti* H-14, utilizou pó umectante (3500 AA/mg) e líquido concentrado (1000 AA/mg) (AA= Unidades Tóxicas Internacionais em *Ae. aegypti*). Em uma seção de laboratório, que simulava as condições naturais de criação de *Ae. aegypti*, realizaram-se testes com quatro doses diferentes de cada uma das duas formulações. Com uma dose de 1050 AA/L, encontrou-se uma ação residual de 11 dias com o pó umectante e de 9,9 dias com o líquido concentrado. A ação residual não aumentou em proporção direta com a dose. Os trabalhos em condições naturais foram realizados aplicando uma dose de 1050 AA/L. O *Bti* H-14 foi efetivo, ao causar 100% de mortalidade em todos os estádios larvários de *Ae. aegypti* nos criadouros tratados. Obteve-se uma ação residual de 9 dias nos criadouros quando foi aplicado o pó umectante e 7,2 dias quando foi aplicado o líquido concentrado. Ressaltou o uso do *Bti* H-14, como larvicida alternativo em situações especiais, onde os métodos químicos são indesejáveis ou impraticáveis.

A susceptibilidade de larvas de *Ae. aegypti* coletadas no campo foi avaliada por Andrade e Modolo (1991), em termos do tempo letal médio (TL₅₀) e da mortalidade final, quando tratadas com temephos (químico), *Bti* ou misturas desses dois agentes. As larvas do terceiro ínstar mostraram-se mais susceptíveis ao patógeno do que aquelas no início ou no fim do quarto ínstar. A sobrevivência de alguns indivíduos aos tratamentos com temephos permite sugerir a possibilidade de resistência. Foi detectada a existência de sinergismo temporal, quando larvas no início do quarto estágio foram tratadas com as misturas do *Bti* com o temephos. Sugerem, ainda, neste trabalho, que a integração dos inseticidas químicos e biológicos para o controle de larvas de mosquito pode ter, como principal vantagem, a morte mais rápida, o que evitaria a passagem da fase larvária L₄ para a fase de pupa, a qual não se alimenta e por isso impede a ação do bioinseticida, além de permitir um tratamento mais econômico. Como uma vantagem adicional, o controle integrado pode também reduzir a pressão normal para com a seleção de resistência comum no inseticida químico usado rotineiramente.

Santos et al. (1994), estudaram a eficácia do *Bti* H-14 como agente de controle de mosquitos vetores da Dengue em cemitérios de Campinas – SP, associado ao desempenho de uma equipe municipal de Saúde Pública. Com relação aos métodos convencionais (químico e mecânico) os resultados obtidos indicaram vantagens na utilização do método biológico executado pelas equipes de Saúde Pública no manejo desses culicídeos. O emprego do *Bti* H-14 mostrou-se seguro e econômico. Apenas com um treinamento rápido e pouca mudança na rotina das atividades da equipe municipal considerada, foi obtido mais de 99% de eficiência após uma série de três aplicações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, constam as descrições do material e dos parâmetros analisados na maior parte dos ensaios que se seguem.

MICROORGANISMO

Os ensaios foram realizados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (sorotipo H-14). A linhagem foi repicada rotineiramente em tubo inclinado com meio de cultura ágar-nutriente mantido à 28°C por 72 horas e, a seguir, mantida à temperatura de 4°C em refrigerador.

CRESCIMENTO CELULAR

A determinação do crescimento celular foi realizada em intervalos regulares. As amostras retiradas (3mL) foram centrifugadas a 10.000 rpm, por três vezes, durante 10 minutos, realizando-se uma “lavagem das células” com água destilada nas duas últimas vezes. Por fim, a densidade óptica da suspensão foi determinada em espectrofotômetro, a 620 nm em aparelho Ultropec 3000 Uv/Visible, Pharmacia Biotech.

pH

O pH foi monitorado em aparelho Analion PM 608, a fim de se averiguar possíveis alterações deste durante o processo que pudesse ocasionar alguma influência na produção de esporos e cristais.

VERIFICAÇÃO DE ESPOROS E CRISTAIS POR MICROSCOPIA

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Olympus DX 60, em sistema de contraste de fase, em objetiva de 100 vezes e as imagens, digitalizadas em sistema analisador de imagens acoplado (IMAGE – PRO – PLUS ® MEDIA, Cybernetics). Nesta metodologia, os esporos são vistos em formato elipsóide e brilhantes. Os cristais também são brilhantes em formato irregular e tamanho entre $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ do tamanho do esporo.

QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS

Para quantificação dos esporos, foi realizada uma técnica de plaqueamento com choque térmico, conforme Alves e Moraes (1998), na qual as diluições, após serem preparadas como de costume, são inoculadas em cinco ou seis pontos na superfície do meio de cultura ágar nutriente, no volume de 5 μ L/ponto, tendo-se o cuidado de deixar as placas abertas em ambiente estéril, até a secagem da suspensão inoculada. Em seguida, as placas são incubadas a 30°C durante cerca de 10 horas, após o que se efetua a contagem das colônias, preferencialmente usando-se um contador de colônias. Uma boa precisão na contagem é obtida quando se tem, em média, entre 20 a 40 colônias/ponto. Para um melhor aproveitamento de meios e materiais, as placas foram divididas ao meio, sendo que cada metade poderia ser relativa a diluições diferentes.

A Foto 2 demonstra a metodologia.

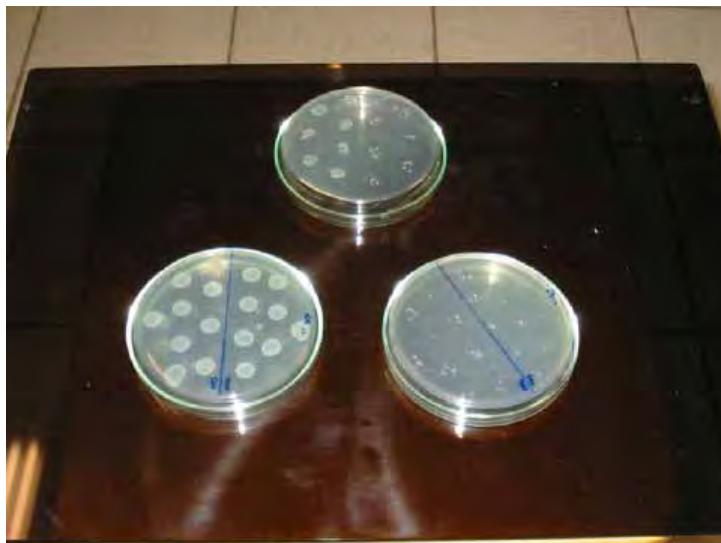


Foto 2 – Técnica da “micro-gota”: placas de contagem de colônias de *Bti* em diluições variadas.

DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA DQO (Demanda Química de Oxigênio)

Para se medir a DQO*, foi utilizado o método colorimétrico de refluxo fechado, utilizando o aparelho da Hach Co, segundo metodologia da American Public Health Association (1995).

DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR

A quantidade de açúcar redutor foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944). A concentração de açúcares redutores, expressa em miligramas de glicose por mililitro de solução, foi determinada utilizando-se uma curva-padrão elaborada com soluções padrão de glicose.

* Demanda Química de Oxigênio (DQO) é uma medida da quantidade de carga poluidora existente em um líquido, efetuada através da análise da quantidade de oxigênio consumida por um agente fortemente redutor (em geral, dicromato de potássio), em meio ácido e temperatura elevada, durante duas horas, para digerir a matéria orgânica de uma amostra convenientemente diluída.

BIOENSAIOS

Os preparados foram testados em larvas de quarto instar (Foto 3) de *Ae. aegypti*. Os ovos foram coletados por um órgão brasileiro de controle de endemias (SUCEN – cidade de São José do Rio Preto - SP), através de armadilhas “ovitrampas” instaladas e retiradas semanalmente em 150 domicílios do município. As armadilhas constituíram-se em potes de plástico pretos com abertura de 5 cm de diâmetro por 12 cm de profundidade, contendo 300 mL de água, nos quais foram instaladas paletas de eucatex de 12 cm de comprimento por 2 cm de largura (Foto 7), transformados em criadouros e colocados ao ar livre (Foto 6). Nas laterais, pouco abaixo do topo, foram feitos três pequenos furos para que o recipiente não ficasse cheio de água. Assim, foi possível que o *Aedes* depositasse ovos na paleta deixada parcialmente submersa, já que o mosquito não os coloca diretamente na água. Os 150 potes foram colocados em casas das 14 sub-regiões da cidade e recolhidos semanalmente. As Fotos 4 e 5 mostram as fases subseqüentes à larvária.

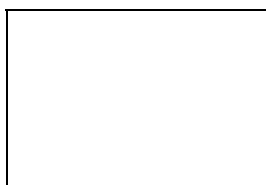
Foto 3 – Larva de *Aedes aegypti*Foto 4 – Pupa de *Aedes aegypti*Foto 5 – Adulto de *Aedes aegypti*

Foto 6 – Armadilhas ovitrampas



Foto 7 – Paletas de eucatex.



Foto 8 – Acondicionamento das paletas no laboratório após recolhimento nos domicílios.

As armadilhas positivas para ovos de *Aedes* foram identificadas e armazenadas em caixa de isopor (Foto 8) e colocadas para eclosão em recipientes de plástico contendo água, cerca de 4 dias antes da realização dos bioensaios, no laboratório de entomologia da SUCEN.

A fim de garantir uma maior produtividade, foi criado também um insetário mantido com mosquitos adultos e semanalmente foi realizado o repasto sanguíneo em um camundongo. Foi preparada uma solução-estoque, pipetando-se 1 mL do fermentado em 99 mL de água destilada, perfazendo uma diluição de 1:100. Potes de plástico, na quantidade específica para cada ensaio, foram, então, completados com 150 mL de água destilada e quinze larvas foram adicionadas a cada pote com utensílio contendo uma pequena peneira. Para perfazer as concentrações de 0,7 à 16 ppm (o espectro testado em todos os ensaios), foram adicionados volumes variáveis entre 10 e 240 μL aos potes, dos quais se retirava, antecipadamente, a mesma quantidade de água em que se ia adicionar em relação ao meios testados, a fim de não se verificar erros de diluições. A CL_{50} foi avaliada pelo método de Probit, versão 1.5 (EPA PROBIT analysis program, 2004).

As Fotos 9, 10 e 11 são relativas à etapas dos bioensaios.



Foto 9 – Separação das larvas de *Aedes aegypti* de mesmo instar para utilização nos bioensaios.



Foto 10 – Larvas em potes de plástico com 150 mL de água.



Foto 11 - Adição das diluições de cada produto nos potes com 150 mL de água.

4 TRABALHO PUBLICADO

REVISTA HOLOS ENVIRONMENT, ISSN 1519-8421, VOL. 01, Nº 01, 2001

UTILIZAÇÃO DE SANGUE DE ABATEDOUROS PARA PRODUÇÃO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.

SAMARA ERNANDES¹ E IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES².

¹ Pós-graduanda em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP. Araraquara, SP –
Brasil.

² Coordenadora da Engenharia Química - Universidade Guarulhos. Docente/ Orientadora do
Programa de Manejo e Conservação de Recursos - CEA/UNESP/Rio Claro.

RESUMO

Foi estudado o desenvolvimento de um microrganismo por fermentação submersa usando sangue de abatedouros de aves e suínos como principal substrato fermentativo, com a finalidade de obtenção de um biopesticida para uso contra pragas da Agricultura ou da Saúde Pública. O objetivo principal foi o de averiguar a viabilidade do sangue (resíduo) de aves e suínos como meio de cultura para *Bacillus thuringiensis*, bem como compará-los quanto à eficácia na produtividade. O processo foi desenvolvido em agitador rotatório, sendo as variáveis do processo fermentativo, pH inicial, temperatura, agitação e aeração respectivamente 7,3; 30 ° C; 150 rpm e a relação 1/5 entre volume de meio de cultura para volume nominal de frasco (50 ml/250 ml). Os experimentos usando sangue como substrato, mostraram que a esterilização do sangue reduz o pH inicial do meio de cultura a níveis incompatíveis com o crescimento bacteriano e o meio de cultura não esterilizado apresentou

bom crescimento do *Bacillus thuringiensis*, com a consequente esporulação e formação de cristais. Foram acompanhados o crescimento, através de densidade óptica, o comportamento do pH, bem como a variação da quantidade de açúcar redutor. Os resultados obtidos permitiram concluir que o sangue de aves especialmente, por permitir crescimento e esporulação mais rápidos, mas também o de suínos, que se constituem resíduos abundantes e poluentes, podem ser utilizados com vantagens para a produção de biopesticidas de *Bacillus thuringiensis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, Resíduos Agropecuários, Sangue de Abatedouros, Processo Fermentativo.

ABSTRACT

Bacterial fermentation, using agroindustrial residues, was studied aiming to obtain a useful biopesticide to control insect pests of the Agriculture or Public Health. Literature deals with Biological Control and Microbial Control definitions, and this paper studied the development of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using residues of animal blood as substrate. A rotary shaker was used and the growth conditions were: initial pH = 7.3; temperature at 30 ° C; agitation rate at 150 rpm, and aeration at a 1/5 volume of the culture flask. Best results using animal blood were gotten with non-sterilized blood, being the growth over chicken blood faster than in the pork blood. The pH behavior in this case was similar to that with culture medium recognized as good sources. It was concluded that the animal blood studied was a very good source for the development of the biopesticide using *Bacillus thuringiensis*, besides the advantage of the reduction of this pollutant material (non costly source).

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, chicken blood, pork blood, submerged fermentation.

INTRODUÇÃO

Estima-se que sejam conhecidos 1 milhão de espécies de insetos, de um total de mais de 2,5 milhões que, provavelmente, ocorrem sobre a Terra. Desse total, cerca de 10% podem ser considerados pragas da agricultura ou pragas urbanas. Assim, se cada espécie de inseto for atacada por, no mínimo um patógeno, pode-se inferir que a patologia de insetos e o controle microbiano terão, no futuro, importância relevante no controle dos insetos-praga e na cura de doenças dos insetos úteis (ALVES, 1998).

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. Pesticidas microbianos são formulações que contêm os esporos, células vegetativas ou algum metabólito do desenvolvimento dos microrganismos patogênicos e que mantêm a característica de entomopatogenicidade. As bactérias, representadas principalmente pelas diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis*, são os patógenos que, nos últimos trinta anos, receberam maior atenção por parte das indústrias em todo mundo. Cerca de 50% das formulações de produtos microbianos existentes no mercado são produzidos à base das diversas espécies e variedades de *Bacillus* (HABIB E ANDRADE, 1998).

Quando se trabalha em escala laboratorial, o meio de cultura para fermentação é geralmente preparado usando um dos meios padronizados pelos grandes laboratórios. Para isolar microrganismos ou promover o crescimento de bactérias em tubos de ensaio, o alto

custo desses meios é mais do que compensado pela reprodutibilidade e facilidade de uso. Entretanto, quando grandes quantidades de meio de cultura são necessárias, é preciso encontrar fontes alternativas de nutrientes. Obviamente que tais materiais, devido ao seu baixo custo, não são puros nem padronizados quanto os seus similares laboratoriais (SALAMA E MORRIS, 1993).

A fim de minimizar o custo de produção, a maior parte das fontes nutricionais são encontradas entre bioprodutos, resíduos agrícolas ou águas residuárias industriais. Sendo assim, como fonte de carbono podem ser usados melão de cana, melão de beterraba e amido/fécula de cereais, raízes ou tubérculos. O nitrogênio pode ser suprido com sais de amônio, porém como fontes mais econômicas temos a água de maceração de milho, farinha e farelo de soja e caseína hidrolisada (ERNANDES E MORAES, 1997 a).

Outros sub-produtos além dos descritos foram estudados e alguns trabalhos foram desenvolvidos com sangue como substrato fermentativo (ERNANDES E MORAES, 1997b;1998). Dados preliminares de fermentações realizadas com *B. thuringiensis*, tendo como substrato sangue de aves e suínos sugerem que estes substratos são viáveis na medida em que promoveram o crescimento do microrganismo (ERNANDES E MORAES,1997 a), corroborando, também, o perfil de pH, em trabalhos com "milhocina" e melão de cana (MORAES, 1976). Trabalho com sangue de suínos, estudando o efeito da esterilização do meio de cultura composto com estes substratos, verificou pequeno crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meios esterilizados (SOUZA ET AL., 1998).

O sangue recolhido por ocasião do abate dos animais nos matadouros constitui um resíduo de elevado valor nutritivo, sobretudo em virtude de suas proteínas, ricas em ácidos aminados essenciais, vitaminas e sais minerais, ao par do seu alto coeficiente de digestibilidade. Apesar do uso consagrado do sangue, como descrito anteriormente, é altamente preocupante o baixo

índice de aproveitamento desse resíduo, sobretudo nos estabelecimentos menos qualificados, ainda que ele se destine a fins de alimentação animal, a fertilizante ou a certos empregos industriais. É indispensável que se faça algo para evitar o desperdício que se traduz, também, em acentuada poluição ambiental, em prejuízo econômico e no desvio de matéria-prima nobre, cujo plasma, cita-se na literatura, constitui-se excelente meio de cultura (SOUZA ET AL., 1998).

O objetivo deste trabalho foi comparar o desenvolvimento de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, em meios contendo sangue de abatedouros de aves e suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismo

Os experimentos foram realizados com o *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*.

2. Meios de cultura

Para manutenção do microrganismo foi empregado o agar nutriente, em tubos-estoque (mantidos à temperatura de 4° C, em refrigerador). Repiques trimestrais da cultura foram efetuados para sua manutenção. A cada repique a cultura foi mantida em estufa a 30°C por 72 horas, a partir do qual foi novamente estocada sob refrigeração.

2.1 Meios de fermentação

Para este trabalho, os resíduos foram escolhidos baseados em análise prévia de seus constituintes bioquímicos, realizados pelo laboratório do abatedouro fornecedor, bem como na proximidade da instituição fornecedora do material ao local onde o trabalho foi

executado. O volume de resíduos obtido para utilização no processo foi mantido em congelador para posterior utilização, visando seu uso com as mesmas características.

Os meios de cultura foram compostos pelo sangue nas concentrações de 50 e 100g/l e glicose na concentração de 6 g/l, a qual proporciona um maior crescimento bacteriano, em detrimento à concentrações superiores ou inferiores que diminuem o valor de biomassa obtido (MORAES,1976).

A esterilização pelo calor em meios contendo sangue tem algumas implicações negativas para a realização de fermentações, tais como a coagulação de proteínas e o abaixamento brusco de pH. Neste trabalho, os experimentos com sangue foram realizados sem esterilização. Contudo, houve o monitoramento através de microscopia em contraste de fase para constatar qualquer contaminação.

As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura, acondicionados em agitador-incubador, sendo 150 r.p.m. a agitação, 30° C a temperatura e o tempo de processo variando entre 24 e 96 horas.

3. Inóculo

Nos experimentos iniciais com sangue de suíno e ave optou-se por inocular usando uma suspensão de células equivalente a $3,4 \times 10^8$ células/ml.

4. Determinação do crescimento celular

Foi monitorado o crescimento celular medindo-se a turbidez, em espectrofotômetro, do meio de cultura em diversos tempos de fermentação, a variação de pH do meio (pHmetro) e a variação da quantidade de açúcar redutor, através do método de Somogy-Nelson.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

COMPARAÇÃO DO PADRÃO DE CRESCIMENTO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EM SANGUE DE AVE E SANGUE DE SUÍNO.

A Figura 6, a seguir, apresenta uma comparação do crescimento de *B.thuringiensis* nos dois resíduos estudados, podendo-se observar que o crescimento do microrganismo é maior e mais rápido em sangue de ave. Entretanto, o padrão de crescimento parece ser o mesmo tendo em vista o pico que ocorre em torno de 36 horas. Após esse tempo o processo em sangue de ave inicia o declínio e em sangue suíno continua um crescimento lento, quase como se fosse uma fase estacionária.

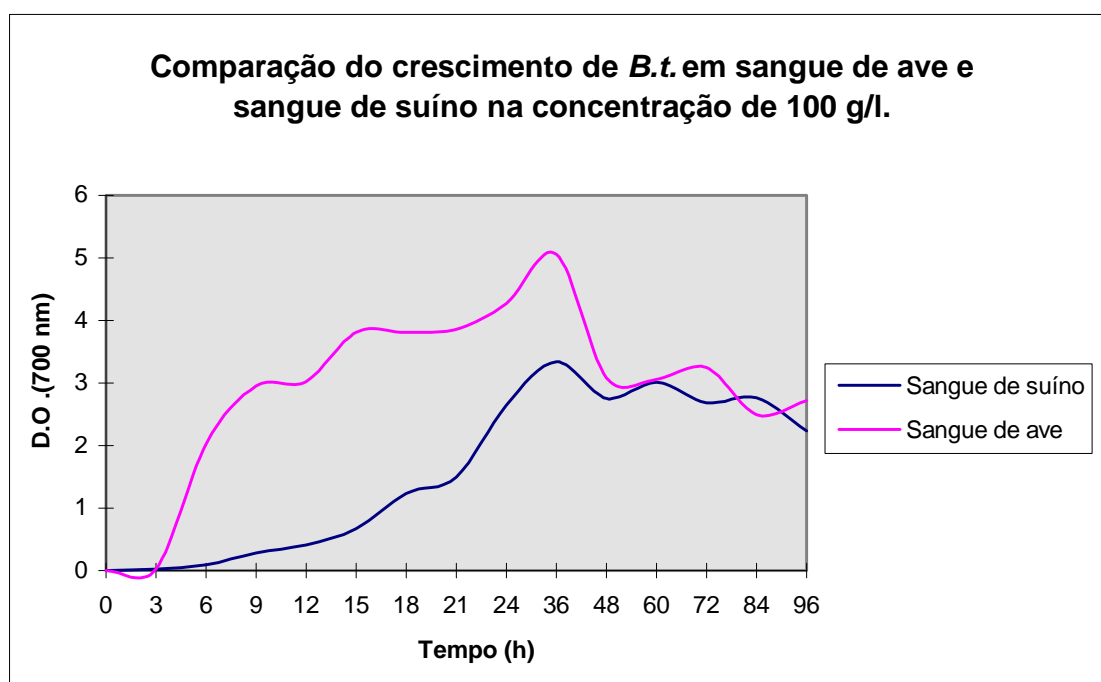


Figura 6 - Comparação do crescimento de *Bacillus thuringiensis* em sangue de ave e em sangue de suíno na concentração de 100 g/l e glicose 6 g/l.

O comportamento do pH e do consumo de açúcar foi similar nos dois resíduos estudados. Quando se obtém o máximo valor em densidade óptica (biomassa), aproximadamente por volta de 36 horas, opostamente, verifica-se o menor valor de pH e um esgotamento do açúcar no meio de cultura.

Para *Bacillus*, nas fermentações que contam com a glicose como fonte de C, esta é geralmente convertida a ácidos orgânicos, com uma marcante queda do pH do meio de cultura. Como o baixo pH é desfavorável à formação adaptativa e enzimas e à ação do ciclo de TCA (ácido tricarbóxico), a queda da concentração do carboidrato além de um determinado nível, interrompe o crescimento exponencial. Assim, a utilização dos ácidos produzidos, além da síntese de metabólitos amoniacais, faz com que o pH retorne à neutralidade (ou aumente) e a célula esporule (MURREL, 1967).

Nas condições experimentais empregadas, pode-se concluir que o sangue de aves e de suínos utilizados neste trabalho podem ser usados em processos fermentativos para obtenção do bioinseticida de *Bacillus thuringiensis*. O uso do sangue de suíno é viável, porém o rendimento em biomassa de *Bacillus thuringiensis* é menor que em sangue de aves, à mesma concentração. Um maior número de concentrações deve ser estudado para efetivas comparações. Próximas pesquisas, para o desenvolvimento de uma tese de Doutorado, serão realizadas para verificar a viabilidade de uso desse bioinseticida contra *Aedes aegypti*, importante praga da Saúde Pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.1, p. 21-37.
- ERNANDES, S., MORAES, I. O. Estudos preliminares do efeito da fonte de nitrogênio no crescimento de *Bacillus thuringiensis*. In: 24º COLÓQUIO DE INCENTIVO À PESQUISA, São José do Rio Preto. *Caderno de Resumos*. 1997a. Sessão B - Biológicas, pág. 36.
- ERNANDES, S., MORAES, I. O. Verificação do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis*, obtido por fermentação submersa em meio de cultura composto por resíduo agroindustrial. In: II SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas. *Anais*. 1997b. Pag 104.

- ERNANDES, S., MORAES, I. O. Estudo comparativo do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis* em fermentação submersa contendo sangue de ave e sangue de suíno. In: VI SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Rio de Janeiro. *Anais: Sessões de Pôsteres*/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1998. Pág 90.
- MORAES, I. O. Ensaio de fermentação submersa para produção de inseticida bacteriano em minifermentador. Campinas, 1976. 76 pp. Tese de Doutorado.FEA/UNICAMP.
- HABIB, M.E.M; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 12, p.383-432.
- MURREL,W.G. The biochemistry of the bacterial endospore. In: "Advances in Microbial Physiology" p. 133. Acad. Press, 1967.
- SALAMA, H. S., MORRIS, O. N. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis*, Na Environmental Pesticide: Theory and Practice. England: John Wiley & Sons, 1993. Chap. 11, 237-253.
- SOUZA, K. B.; MORAES, I.O.; ERNANDES, S. Estudos dos efeitos da esterilização em meio de cultura composto de sangue de suíno na produção de *Bacillus thuringiensis* . Livro de Resumos. I ENEALI - Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia de Alimentos . Viçosa/MG 1998.

5 TRABALHO SUBMETIDO

REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ, ISSN 0074-0276

PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO E TRIPTOSE COMO MEIOS DE CULTURA

Samara Ernandes/+, Vanildo Luiz Del Bianchi, Iracema de Oliveira Moraes*, Angélica Oshiro, Rodrigo Garcia Fleming, Ricardo Alexandre Fochi, Roberta Seixas
+ Dept. Engenharia e Tecnologia de Alimentos – UNESP – São José do Rio Preto, SP
*Universidade de Guarulhos –UnG- Guarulhos, SP

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) produz proteínas de ação biopesticida, as quais podem ser utilizadas para o controle de culicídeos transmissores de doenças, especialmente o *Aedes aegypti*, vetor da dengue. O biopesticida tem sido produzido por fermentação submersa, sendo que, no Brasil, a produção se restringe a alguns centros de pesquisa e, mais recentemente, a uma pequena empresa. Para que a implementação do controle de vetores através de biopesticidas seja viável, é fundamental que haja estudos no sentido de aprimorar os meios de cultura, aliando eficácia com baixo custo de produção. Sendo assim, tem-se utilizado, como ingredientes para o meio de cultura, resíduos ou subprodutos agroindustriais, os quais ainda são sub-utilizados e contêm, em sua maioria, constituição nutricional que proporciona condições ideais para o crescimento do microrganismo. Neste trabalho, utilizou-se como meio de cultura, um subproduto da indústria do processamento do milho, a “milhocina”, em comparação a meio contendo a fonte de nitrogênio triptose. Os parâmetros acompanhados foram o crescimento celular, por densidade óptica, produção de esporos, por plaqueamento em Agar-nutriente e a CL 50 (concentração letal média), através de bioensaios. De uma forma geral, o meio à base de milhocina proporcionou melhores resultados. Ambos os meios foram comparados também, quando adicionados de glicose, o que ocasionou uma maior eficácia, o que pode ser comprovado através dos bioensaios.

Key words: *Bacillus thuringiensis israelensis* – *Aedes aegypti* – biological vector control

5.1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é conhecida mundialmente por produzir toxinas de ação bioinseticida, especificamente para culicídeos, dentre os quais o *Aedes aegypti*, vetor da dengue. É inócua ao homem e outros mamíferos, porém o principal

obstáculo para a sua produção reside principalmente no custo, quanto ao meio de cultura a ser utilizado (ERNANDES et al., 2002).

Quando se trabalha em escala laboratorial, o meio de cultura para fermentação é geralmente preparado usando um dos meios padronizados por grandes laboratórios. Entretanto, quando grandes quantidades de meio de cultura são necessárias, é preciso encontrar fontes alternativas de nutrientes, a despeito da destituição de pureza ou padronização relacionada aos seus similares laboratoriais (ERNANDES, 1998).

A fim de minimizar o custo de produção, a maior parte das fontes nutricionais são encontradas entre bioprodutos, resíduos agrícolas ou águas residuárias industriais. Neste sentido, destaca-se a água de maceração de milho, solução concentrada obtida da maceração dos grãos de milho, contendo em sua composição química carboidratos solúveis, aminoácidos e sais minerais (HULL et al., 1996; ERNANDES, 1998; INGREDIENTE protéico MILHOCINA® 2004).

Existem importantes relatos do uso da água de maceração de milho como fator marcante para a produção comercial de penicilina na década de 1940. Neste período, ocorria a 2ª Guerra Mundial e a demanda por esta droga era cada vez maior, visando o tratamento dos soldados vitimados. Um grupo de pesquisadores de Peoria, Illinois, utilizando a água de maceração de milho no processo de produção, o qual era um resíduo abundante, de baixo custo na região, verificou um rendimento aumentado em 12 à 20 vezes devido à concentração de nutrientes que o resíduo continha (BHANDARI, 1996; FOGEL; ROGERS, 2002).

Hull et al. (1996) estudaram a composição bioquímica da água de maceração em etapas variadas do processamento do milho e salientam que, toda a água produzida no processo de maceração é evaporada até formar-se um líquido espesso, constituído de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, compostos orgânicos, metais pesados, íons inorgânicos e fostatos. Microrganismos, especialmente lactobacilos, são detectados no processo e contribuem para a

fermentação do líquido remanescente, antes da etapa final que constitui a concentração do líquido obtido. Como resultado da fermentação, existe a produção de alguns aminoácidos e ácido láctico, que juntamente com a presença de dióxido de enxofre, utilizado no início da moagem, confere um pH em torno de 3,5-4,3 ao produto final.

Em análise de rotina da então Refinações de Milho Brasil S. A. (comunicação oral)*, em setembro de 1997, obteve-se uma composição de 7,5% de açúcar redutor, 17 % de ácido láctico, 45 % de proteínas, 96,2% de insolúveis e pH em torno de 4,0 - 4,5. Em outras análises, tem-se a taxa de nitrogênio total variando de 3,7 a 4,3 % (ERNANDES, 1998).

Moraes (1973), efetuando estudos com treze meios de cultura visando a obtenção do máximo rendimento celular de *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367 e *Bacillus thuringiensis* NCIB 9207, utilizou água de maceração de milho (“milhocina”) na concentração de 10 g/L, verificando que o rendimento do meio com este resíduo foi ligeiramente superior ao meio contendo melaço, na mesma concentração. A mesma autora, em 1976, estudando vinte e oito meios de cultura visando encontrar, dentre estes, o mais viável economicamente, utilizou concentrações crescentes de “milhocina”, partindo da concentração de 20 g/L até a máxima de 100 g/L. Como resultado, verificou que o teor ideal deste resíduo situou-se ao redor de 25 g/L.

O presente trabalho objetivou verificar o crescimento celular, por densidade óptica, de *Bti* em processo fermentativo submerso, além da produção de esporos e a CL₅₀ dos preparados obtidos, de forma comparativa entre meios contendo uma fonte padronizada de nitrogênio, a triptose e outra contendo um subproduto do processamento industrial do milho, a água de maceração (“milhocina”). Os mesmos meios foram também comparados, obedecidos os mesmos parâmetros de avaliação, quando acrescidos de glicose.

* Informação concedida pelo setor de Controle de Qualidade da então Refinações de Milho Brasil S. A.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Inóculo e Fermentação

Os meios de fermentação foram compostos por quatro soluções, duas contendo triptose na concentração de 20g/L, NaCl a 5g/L e Na₂HPO₄ a 2,5g/L e outras duas contendo os mesmos componentes, exceto a triptose, que foi substituída pela “milhocina”. Em duas das soluções (uma contendo triptose e outra contendo “milhocina”) foi adicionada glicose na concentração de 4g/L. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura, acondicionados em agitador-incubador, a 150 r.p.m., 30°C, por 120 horas.

Foi realizada uma pré-fermentação utilizando os mesmos meios da fermentação, com duração de 15 horas, sendo o inóculo três alçadas do microrganismo retiradas diretamente do tubo de manutenção. O inóculo da fermentação consistiu em 1mL do pré-inóculo.

5.2.2 Parâmetros acompanhados

Neste experimento foram averiguados o crescimento celular, por densidade óptica, a variação de pH, o surgimento de esporos e cristais, por microscopia, a quantificação de esporos, por plaqueamento em ágar nutriente e a CL₅₀, através de bioensaios com *Ae. aegypti*.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Experimentos com triptose, com e sem glicose.

Com relação aos valores de densidade óptica, estes foram crescentes até o período de 16 horas, para ambos os meios, tendo a glicose influenciado positivamente o crescimento (Figura 7).

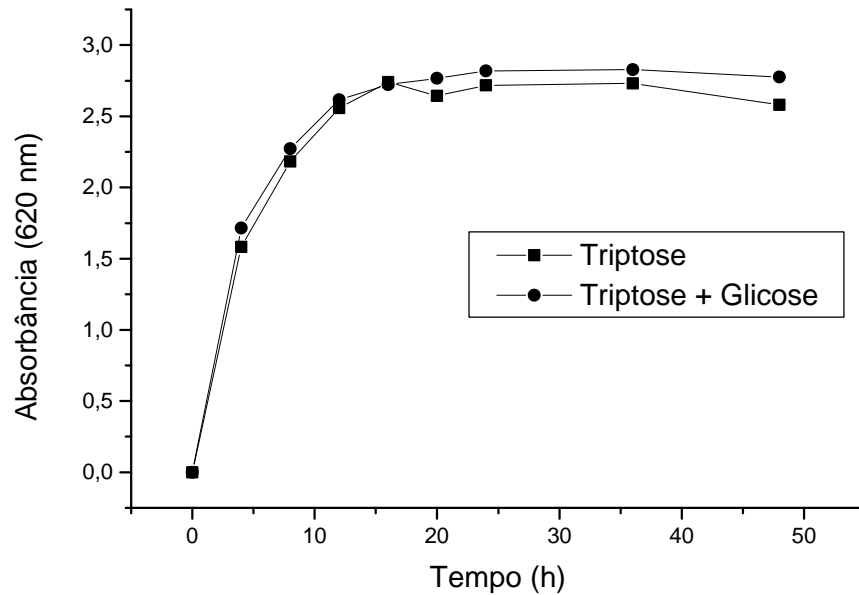


Figura 7 - Crescimento de *Bti* em meios compostos por triptose e triptose + glicose.

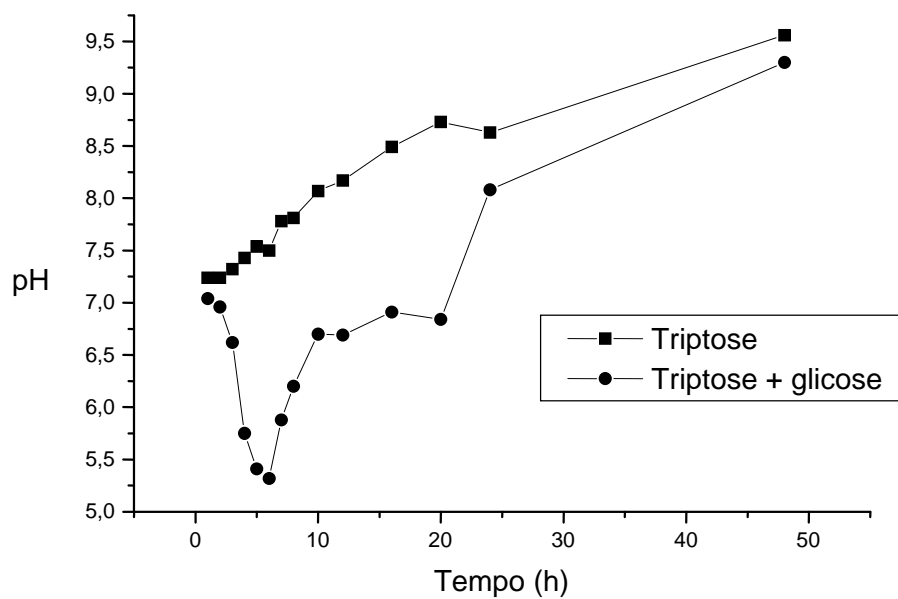


Figura 8 – Variação de pH em meios compostos por triptose e triptose + glicose.

O pH comportou-se diferentemente nos meios com e sem glicose. O meio sem glicose apresentou praticamente um crescimento contínuo e linear de pH durante as 48 horas. O meio com glicose mostrou uma queda brusca de pH durante as primeiras 24 horas (Figura 8). Isto pode sugerir a utilização de duas vias metabólicas que, aparentemente, conduzem a resultados parecidos no crescimento celular, com pequena vantagem nos meios com glicose, como já foi citado.

No acompanhamento por microscopia, foi possível evidenciar o aparecimento de esporos e cristais a partir de 24 horas do processo. Nas Fotos 12 e 13, estão representados os perfis ao final do processo, em 120 horas.

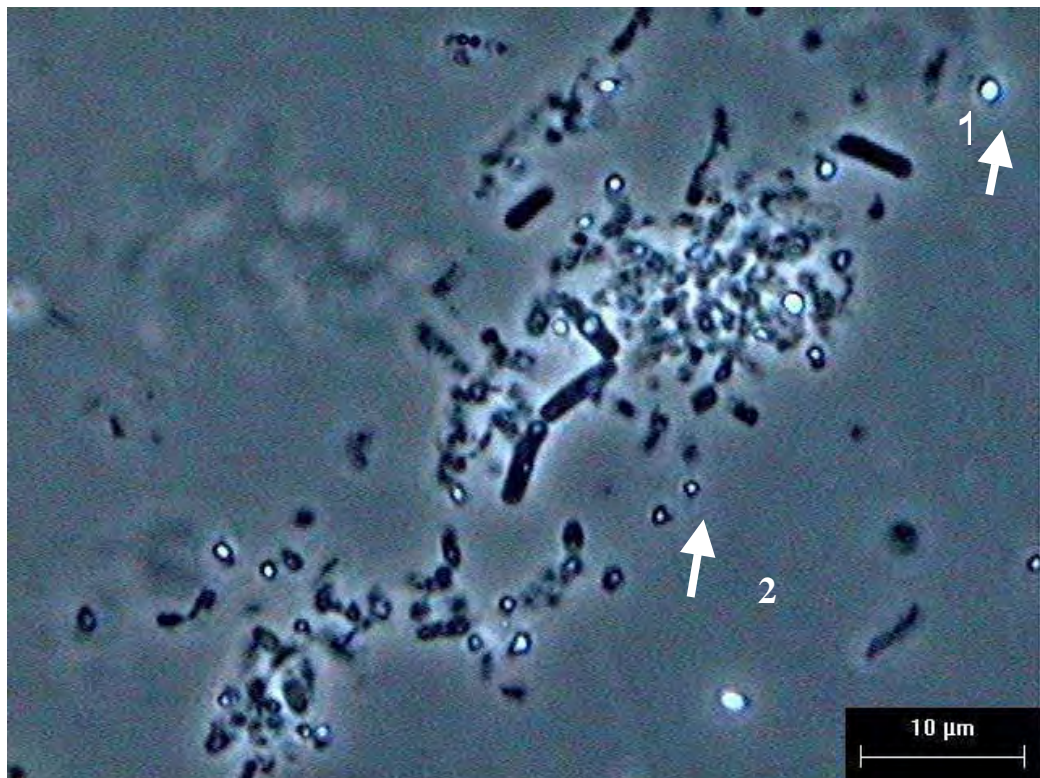


Foto 12 – Visualização de esporos e cristais em meio de triptose com glicose, em 120 horas do processo fermentativo. 1: Esporo 2: Cristal

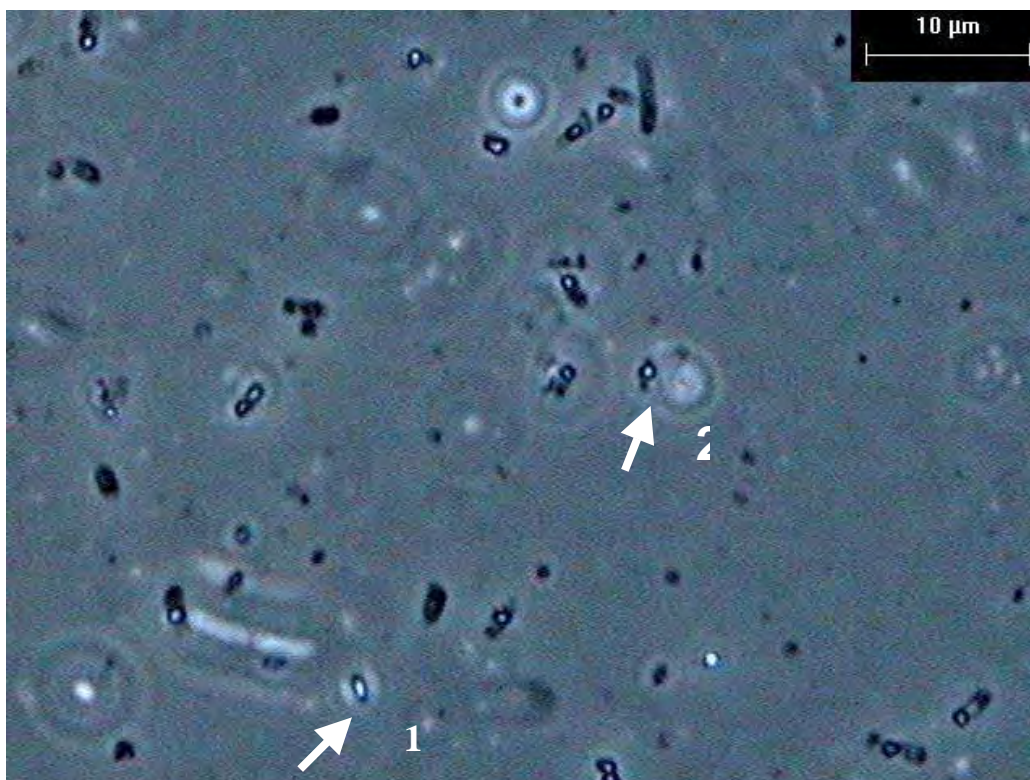


Foto 13 – Visualização de esporos e cristais em meio de triptose sem glicose, em 120 horas do processo fermentativo. 1: Esporo 2: Cristal

Através de plaqueamento, em ágar-nutriente, foi obtido o número de esporos (Tabela 3).

5.3.2 Experimentos com “milhocina”, com e sem glicose.

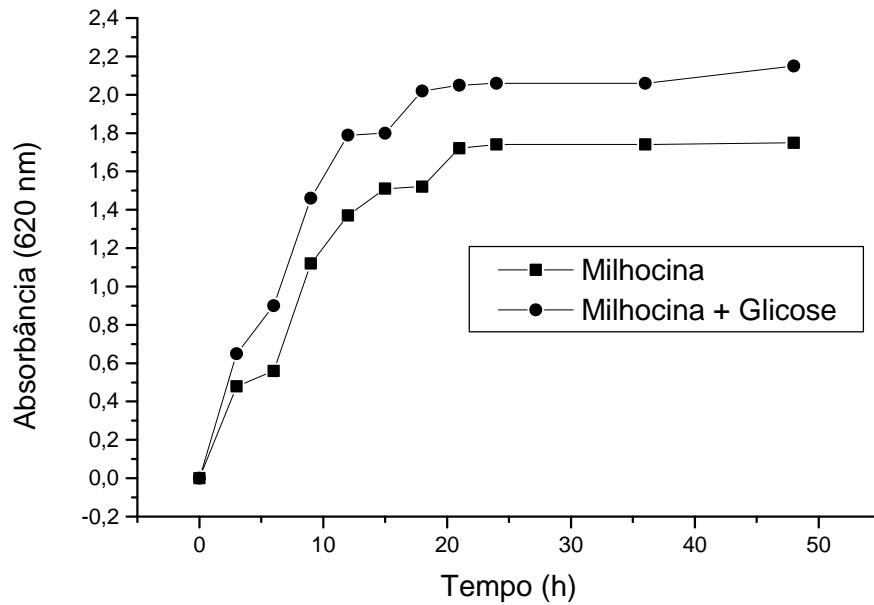


Figura 9 - Crescimento de *Bti* em meios compostos por milhocina e milhocina + glicose.

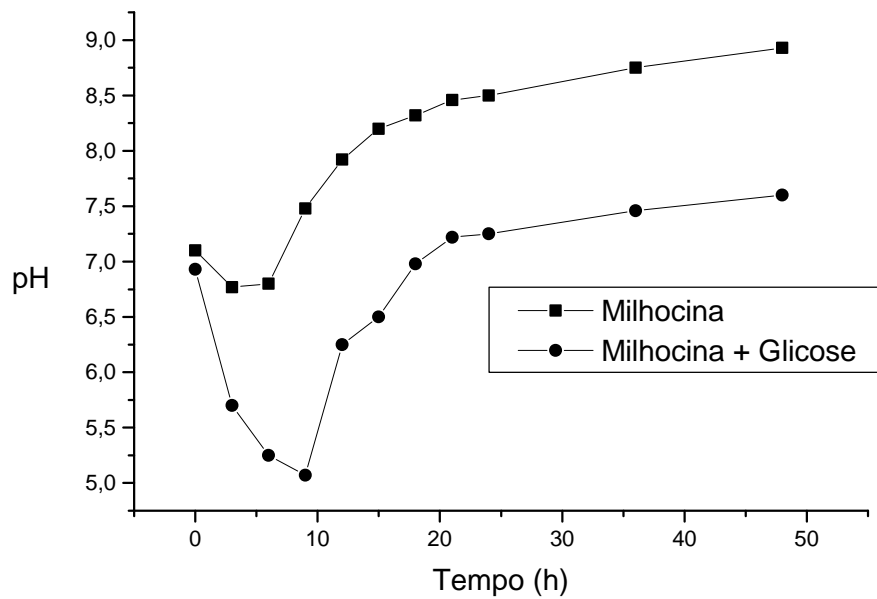


Figura 10- Variação de pH em meios compostos por milhocina e milhocina + glicose.

Através da análise das Figuras 9 e 10, verifica-se um maior crescimento do *Bti* em meio de “milhocina” complementado com glicose. Em relação ao pH, evidencia-se novamente o comportamento apresentado no estudo anterior, com o meio com glicose apresentando acentuada queda de pH (produção de ácido, a partir do açúcar), em relação ao meio sem

glicose e ambos da ordem de 20%, voltando a assumir resultados crescentes até o final do processo. O meio sem glicose apresenta uma leve queda de pH nas primeiras 6 horas e para o meio de triptose é quase imperceptível. A partir deste ponto, sofre uma elevação, que é bastante acentuada, ao final de 48 horas, nos meios sem a glicose.

Nas Fotos 14 e 15 estão representados esporos e cristais em meios de “milhocina” com e sem glicose, ao final do processo fermentativo. Em geral, o meio com “milhocina” sem a glicose apresenta esporos e cristais em quantidade ligeiramente menor que o de “milhocina” com glicose.

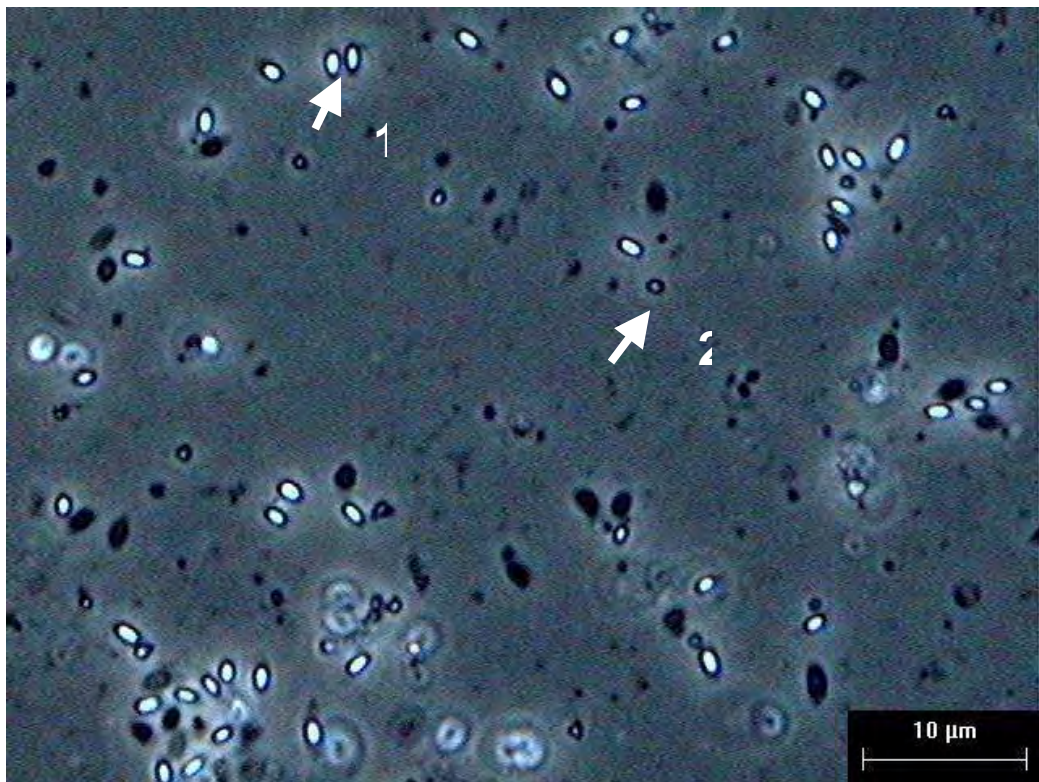


Foto 14 – Visualização de esporos e cristais em meio de “milhocina” com glicose, em 120 horas do processo fermentativo. 1: Esporo 2: Cristal

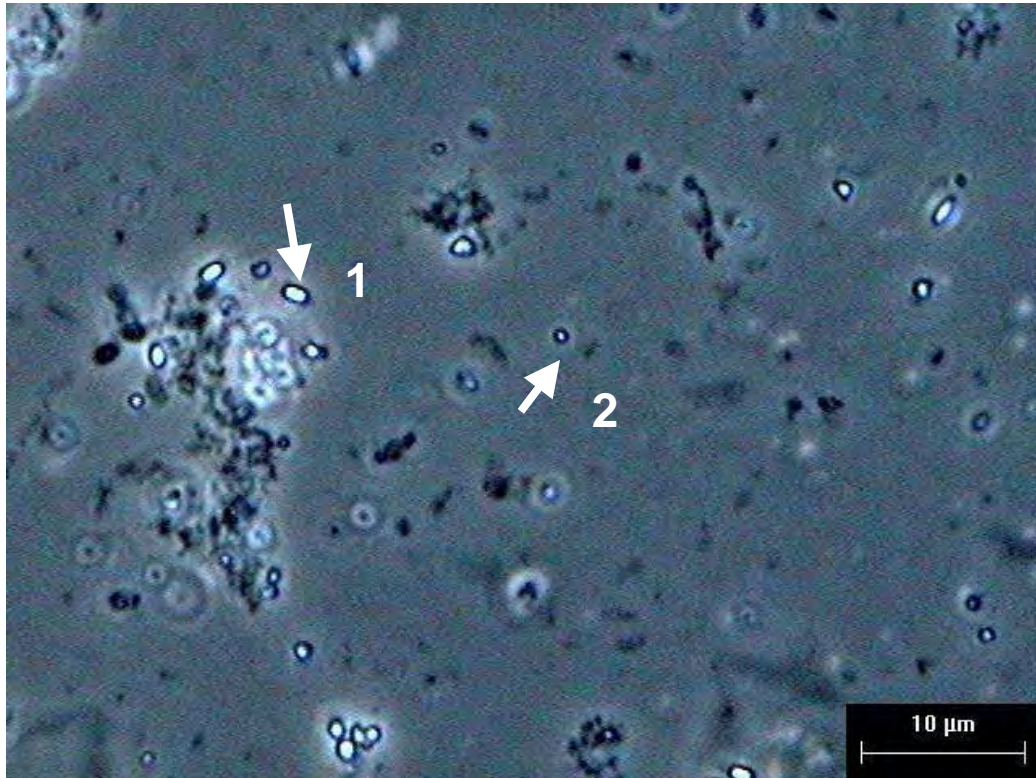


Foto 15 – Visualização de esporos e cristais em meio de “milhocina” sem glicose, em 120 horas do processo fermentativo. 1: Esporo 2: Cristal

Também através de plaqueamento em ágar-nutriente, foi obtido o número de esporos (Tabela 3).

Analisando-se a Figura 11, onde são demonstrados resultados de bioensaios realizados com os fermentados em estudo, percebe-se uma mortalidade de 100% nas concentrações de 12 e 14 ppm para todos os produtos testados. O fermentado à base de milhocina foi o que apresentou uma maior eficácia, com mortalidade em concentrações muito baixas. Ênfase pode ser dada ao produto acrescido de glicose.

Comparando-se os produtos à base de triptose, novamente a adição de glicose é fator diferencial em relação à eficácia na mortalidade das larvas.

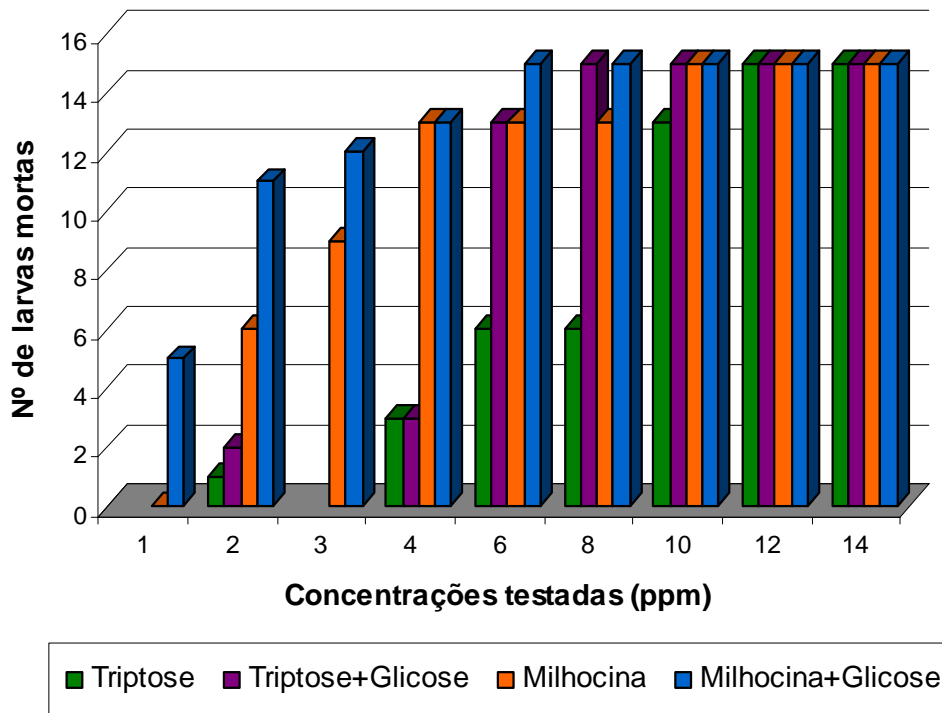


Figura 11 – Número de larvas mortas por meio de cultura em cada uma das concentrações testadas.

Através do programa Probit, versão 1.5, foi calculada a CL_{50} de cada produto, que pode ser verificada na Tabela 3. Os resultados corroboram a discussão anterior, onde tem-se que a menor CL_{50} é obtida com o meio de “milhocina” e glicose, enfatizando a superioridade deste subproduto, sobretudo quando é acrescido de glicose, na produção das toxinas. Em contrapartida, a maior CL_{50} é obtida com o meio de triptose, o que o inviabiliza como meio de cultura para produção de *Bti* em larga escala e, indiretamente, reforça o papel da glicose como importante nutriente, nos meios estudados, para a eficácia do bioinseticida.

Tabela 3 - CL 50 e produção de esporos em meios de milhocina e triptose.

| Meios testados | CL 50 (ppm) | Esporos (UFC/mL) |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Triptose | 6,26 | 9×10^7 |
| Triptose + Glicose | 4,15 | 2×10^8 |
| “Milhocina” | 2,72 | 2×10^8 |
| “Milhocina” + Glicose | 1,48 | 3×10^8 |

5.4 DISCUSSÃO

Com relação à produção de esporos, analisando-se a Tabela 3, verifica-se rendimento semelhante ao obtido por Abdel-Hameed et al. (1990) com água de maceração de milho, em trabalho utilizando sementes de leguminosas, sub-produtos agroindustriais e melaços na esporulação e produção de toxinas por *Bti*. O mesmo rendimento foi obtido em trabalho utilizando água residuária de lodo para *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) (LACHHAB et al., 2001). Entretanto, é superior, quando se compara aos resultados obtidos por Salama et al. (1983), os quais relatam a obtenção de 10^7 esporos em meio composto por 2% de água de maceração de milho em meio basal (BM), também para produção de *Btk*.

Reforçando os dados de Dulmage (1970), quanto à não existência de correlação entre o número de esporos e a atividade inseticida e de Abdel-Hameed et al. (1991), que verificou uma boa taxa de esporulação para *Bti*, embora uma pequena produção de toxina, obteve-se, neste trabalho, o mesmo comportamento.

Comparando-se os meios em relação à utilização ou não de glicose, observa-se uma eficácia superior nos meios onde esta é utilizada (Tabela 3, Figura 11).

O pH foi monitorado pois, segundo Abdel-Hameed et al. (1990), em experimentos utilizando resíduos para o crescimento de *Bti*, a produção de toxinas não é afetada quando o pH se mantém entre 6,5-7,0. Porém, quando atinge valores acima ou igual a 8, o crescimento bacteriano e a esporulação são afetados, levando à significativa diminuição da produção das toxinas. Portanto, a maior ou menor eficácia de um biopesticida pode ter sua justificativa nos valores de pH atingidos durante o processo fermentativo. Tal comportamento foi verificado quando se observa que nos meios onde o pH ficou elevado, no final do processo, a CL₅₀ foi maior, indicando menor eficácia com relação à atividade bioinseticida (Tabela 3, Figuras 8 e 10).

As CL₅₀ obtidas em todos os meios estudados são superiores às obtidas por Lee e Seleena (1991), utilizando resíduos locais para produzir *Bti*, Melo-Santos et al. (2001), através de avaliação de formulado experimental da FIOCRUZ e Amalraj et al. (2000), utilizando Vectobac AS (suspensão) para *Ae. aegypti*, em laboratório. Entretanto é inferior e, portanto, mais potente, à obtida por Ejiofor e Okafor (1991), utilizando resíduos locais para produzir um preparado designado CMPC-2.

A densidade óptica (DO) dos meios com glicose atingiu valor superior aos dos meios sem o açúcar. Comparando-se os meios à base de triptose com os de milhocina, os primeiros atingiram valores superiores (Figuras 7 e 8), o que é correspondente aos resultados de Lee e Seleena (1991), em que se traçou uma comparação na DO entre um meio contendo resíduo de soja e um meio padrão. O número máximo de células viáveis e endósporos no primeiro (1,15) foi 3,5 vezes mais baixo que aquele do meio padrão (3,99). Moraes (1973) constatou que concentrações crescentes de glicose no meio de cultura, favoreceram o aumento no teor de proteínas do complexo esporo-cristal protéico, tendo sido obtidos os melhores rendimentos com 6 g/L de glicose. Verificou, também, que, utilizando triptose na concentração de 20 g/L,

entre outras fontes de nitrogênio para o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, obteve um rendimento maior em peso seco, comparado ao obtido com as outras fontes padronizadas.

5.5 CONCLUSÃO

Embora a triptose tenha tido um melhor desempenho na geração de células, por densidade óptica, observa-se que, tanto na geração de esporos como na eficiência dos bioensaios, a “milhocina” demonstra ser um melhor meio de cultura. Da mesma forma, verificou-se que a glicose, em ambos os meios, proporciona melhores resultados comparados àqueles em que este açúcar está ausente.

Quando se comparam os custos de um meio de cultura à base de triptose (\$ 282 a \$ 758 por Kg) com o custo da “milhocina” (\$ 0,30 por Kg), verifica-se que a utilização deste subproduto, além de ser o mais eficiente, traria enorme economia quanto ao montante dispendido com o controle de vetores.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hameed A, Carlberg G, El-Tayeb OM 1990. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt - III. Selection of media for δ -endotoxina production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6:313-317.
- Abdel-Hameed A, Carlberg G, El-Tayeb OM 1991 Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt - IV. Characterization of fermentation conditions for δ -endotoxina production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7: 231-236.
- Adams TT, Eiteman MA, Adang MJ 1999. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media. *Bioresource Technology* 67: 83-87.
- Amalraj DD, Sahu SS, Jambulingam P, Doss PSB, Kalyanasundaram M, Das PK 2000. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Tropica* 75: 243-246.
- Bhandari S. Penicillin: The Miracle Drug. Illinois: Illinois Periodicals Online (IPO), (on line, access in 27/02/2004. Available at:<http://www.lib.niu.edu/ipo/ihy960452.html>).

- Dulmage, HT 1970a. Production of the spore- δ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology* 16: 385-389.
- Dulmage, HT 1970b. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 232-239.
- Ejiofor AO, Okafor N 1991. Formulation of a flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 spores and crystals as mosquito larvicide. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 202-206.
- EPA PROBIT analysis program. Versão 1.5. Cincinnati, Ohio: Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency. Arquivo probit.zip (on line, access in 05/03/2004). Available at: www.epa.gov.
- Ernandes S 1998 *Estudos da utilização de sangue de abatedouros como substrato fermentativo para produção de Bacillus thuringiensis por fermentação submersa*. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 81 pp.
- Ernandes S, Del Bianchi VL, Moraes IO, Ricco Medeiros L, Montebelo RH, Yamaoka K. Efeito da glicose sobre o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios de cultura compostos por triptose. Livro de Resumos do 13º Encontro de Biólogos do CRBio-1, São Pedro, Brasil, p. 111.
- Fogel R, Rogers P. Penicillin: the first miracle drug (on line, access in 27/02/2004) Available at: <http://herbarium.usu.edu/fungi/funfacts/penicillin.htm>.
- Hull SR, Yun Yang B, Venzke D, Kulhavy K, Montgomery R 1996 Composition of Corn Steep Water during Steeping. *J Agric Food Chem* 44: 1857-1863.
- INGREDIENTE protéico MILHOCINA®. São Paulo: CORN PRODUCTS BRASIL – Ingredientes Industriais Ltda. Ficha técnica (on line, Access in 22/03/2004). Available at: <http://www.cornproducts.com.br/>.
- Lachhab K, Tyagi RD, Valéro JR 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry* 37: 197-208.
- Lee HL, Seleena P 1991. Fermentation of a Malaysian *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 isolate, a mosquito microbial control agent utilizing local wastes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22 (1): 108-112.
- Melo-Santos MAV, Sanches EG, de Jesus FJ, Regis L 2001. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:000-000.
- Moraes IO 1973. *Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa*. Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 71 pp.

Moraes IO 1976. *Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini-fermentador*. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 77 pp.

Salama HS, Foda MS, El-Sharaby A 1983. Novel fermentation media for production of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 41: 8-19.

6 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANIPUEIRA.

6.1 INTRODUÇÃO

O processo de produção de farinha de mandioca caracteriza-se, de um modo geral, como uma atividade de significativa importância tanto no setor agro-industrial como no aspecto social, tanto pela fixação do homem no campo como pela produção de principal alimento energético para milhões de pessoas no Brasil. Essa atividade produz também, durante as diversas fases do processamento, uma quantidade considerável de materiais que são atualmente descartados como resíduos ou sub-utilizados (DEL BIANCHI, 1998).

Devido à composição química e de acordo com a destinação final, esses materiais geram elevadas cargas poluidoras no que diz respeito à grande quantidade de matéria orgânica e à presença de glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto que causam impactos negativos ao meio ambiente. Com essas características, se esses excedentes fossem manejados com tecnologias apropriadas, poderiam resultar em um reaproveitamento de praticamente todo o material descartado como matéria-prima para outros processos, o que não vem ocorrendo atualmente em grande parte das fábricas desse setor. Existem inúmeras oportunidades que poderiam ser implementadas para o aproveitamento desses resíduos, de modo a proporcionar maior rentabilidade financeira para as próprias empresas ou para suas possíveis futuras subsidiárias. Um destes resíduos, a manipueira, também denominada água da prensa, é, segundo NORMANHA (1982) apud DEL BIANCHI (1998), o suco ou a água de constituição das raízes, removida por prensagem das raízes frescas, picadas ou da massa ralada da indústria da farinha. Contém, em sua composição, uma porcentagem dos diferentes constituintes das raízes, tais como o amido, os sais minerais, as proteínas e os glicosídeos

cianogênicos. A Figura 12 representa o Fluxograma do processo de transformação da mandioca para a produção de farinha.

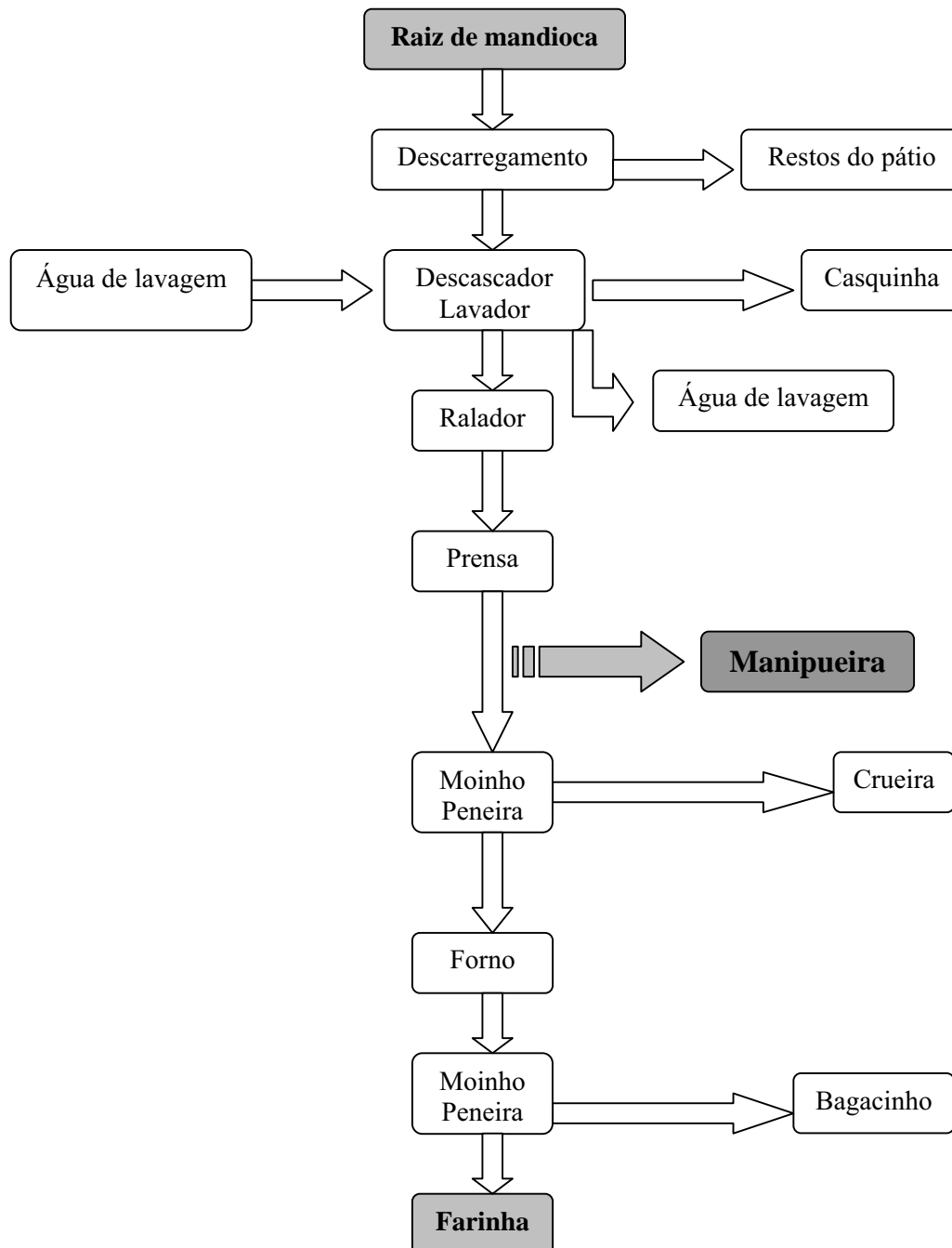


Figura 12 - Fluxograma da produção de farinha de mandioca.

Devido à sua composição, a manipueira é um subproduto potencialmente viável para a produção de bioinseticida à base de *Bti*, bactéria utilizada para o controle biológico de pragas

relacionadas à saúde pública. A Tabela, a seguir, contém dados sobre as características físico-químicas da manipueira (CEREDA, 1994).

Tabela 4– Características físico-químicas de manipueira de indústrias de processamento de mandioca no Estado de São Paulo (média de diversas amostragens).

| VARIÁVEIS | |
|------------------------------|----------|
| UMIDADE (%) | 93,71 |
| SÓLIDOS TOTAIS (%MS) | 6,28 |
| SÓLIDOS VOLÁTEIS (% MS) | 5,23 |
| AMIDO (% MS) | 0,00 |
| CARBOIDRATOS SOLÚVEIS (% MS) | 0,51 |
| LIPÍDIOS (%) | 0,50 |
| CINZAS (% MS) | 1,06 |
| NITROGÊNIO BRUTO (% MS) | 0,49 |
| FIBRA (% MS) | 0,30 |
| LIGNINA (% SV) | 5,98 |
| CIANETO LIVRE (ppm) | 43,75 |
| CIANETO TOTAL (ppm) | 444,00 |
| FÓSFORO (ppm) | 160,84 |
| POTÁSSIO (ppm) | 1.863,50 |
| CÁLCIO (ppm) | 227,50 |
| MAGNÉSIO (ppm) | 405,00 |
| FERRO (ppm) | 15,35 |
| COBRE (ppm) | 1,15 |
| ZINCO (ppm) | 4,20 |
| MANGANÊS (ppm) | 3,70 |
| ENXOFRE (ppm) | 19,50 |
| BORO (ppm) | 5,00 |
| RELAÇÃO C/N | 7,57 |
| RELAÇÃO C/P | 34,43 |
| DQO (ppm) | 6.365,50 |
| ACIDEZ VOLÁTIL (ppm) | 2.703,70 |
| ALCALINIDADE (ppm) | 1.628,00 |
| ACIDEZ TITULÁVEL (%) | 3,27 |
| pH | 4,10 |

MS = Matéria Seca SV = Sólidos Voláteis

FONTE: laboratórios da FCA/UNESP. Dados não publicados.

O *Bti*, descoberto em 1976, em Israel, causando epizootia em larvas do mosquito *C. quinquefasciatus*, apresenta uma potência biológica alta quando comparado aos inseticidas químicos. Estimou-se que o *Bti*, aplicado em proporções da ordem de 25×10^{20} moléculas/ha, é 300 vezes mais potente que piretróides sintéticos e 80000 vezes mais potente que organofosforados. Devido também ao seu modo de ação, o *Bti* é mais específico e, portanto mais seguro para a fauna não-alvo e para o homem. Sua especificidade está relacionada a cinco toxinas existentes em um corpo cristalino que se forma por ocasião da esporulação da bactéria, e que, quando ingeridas, sob as condições alcalinas do intestino das larvas dos

dípteros, quebram-se pela ação de proteinases. Essa quebra libera as frações realmente tóxicas, que então se ligam a receptores específicos da membrana epitelial, provocando poros e rompendo o balanço osmótico do tecido intestinal. Isso leva à lise das células e extravasamento do conteúdo intestinal para a hemolinfa, com conseqüente parada alimentar, paralisia e morte rápida por toxemia (VILARINHOS et al., 1998).

O uso de *Bti* para o controle de mosquitos tem inspirado as mais diversas adaptações. Uma das chaves para o sucesso da produção e comercialização do inseticida bacteriano tem sido o desenvolvimento do meio de cultura. A maioria dos meios de cultura empregados usa produtos totalmente naturais, como fontes de carbono, nitrogênio e sais. Aparentemente, um meio contendo resíduos da agro-indústria e agropecuária de geração local reduziria os custos. Assim, pode-se citar o melaço de cana, a água de maceração de milho, além de outras substâncias potencialmente viáveis, tal como o sangue de ave e suíno (ERNANDES, 1998; MORAES et al., 1998).

Levando-se em conta as freqüentes epidemias de dengue, virose que se caracteriza por um início brusco, febre que dura 5 a 7 dias, cefaléia intensa, dores retro-orbitais, articulares, musculares e erupções cutâneas eritematosas (Fundação Nacional de Saúde, 2002), as quais são transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* e os altos índices de resistência manifestados por esta espécie contra os inseticidas químicos, estudos da produção do bioinseticida tornam-se ainda mais importantes. Ainda com relação aos riscos da doença, do quadro clínico descrito, pode advir o dengue hemorrágico, geralmente em uma segunda infecção, o qual caracteriza-se por manifestações hemorrágicas de gravidade variável (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

Assim, foi estudada a produção de um bioinseticida a partir da manipueira, como ferramenta para auxiliar no combate ao mosquito *Ae. aegypti*, vetor da dengue, analisando-se

o crescimento celular, por densidade óptica, a produção de esporos, a redução de matéria orgânica (DQO), a redução de açúcar redutor e a concentração letal média (CL₅₀).

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Preparo do inóculo

Três alçadas da bactéria em crescimento dos tubos-estoque foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 9 mL de água estéril. Após homogeneização em Vortex, 1 mL desta solução foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de cada um dos meios de cultura estudados e autoclavados a 121° C por 20 minutos. Estes foram incubados em um “shaker” rotatório a 180 r.p.m. (rotações por minuto) e 28° C por 15 horas. Estas células em crescimento ativo foram usadas como inóculo-semente pela transferência de 5 mL para frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL dos meios testados, esterilizados tal como citado anteriormente, perfazendo uma concentração de 1:50 (v/v).

6.2.2 Meios de cultura

Os meios de fermentação foram compostos por “manipueira”, ajustada para pH 7,0 com NaOH 2 N, em diferentes concentrações. Por questões operacionais, o processo foi dividido em 3 etapas, sendo a primeira realizada com as concentrações 25, 50, 75, 125 e 175 mL/L, tendo o processo duração de 48 horas; a segunda etapa, com as concentrações 175, 250, 325 e 400 mL/L e a terceira, com 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L. Estes últimos tiveram duração de 120 horas. As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500

mL contendo 250 mL de meio de cultura, acondicionados em agitador-incubador, a 180 r.p.m. e 28°C.

6.2.3 Parâmetros acompanhados

Neste experimento foram averiguados o crescimento celular, por densidade óptica, a variação de pH, o surgimento de esporos e cristais, por microscopia, a quantificação de esporos, por plaqueamento em ágar nutriente, a CL_{50} , através de bioensaios com *Ae. aegypti*, a determinação da variação da DQO e açúcar redutor.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Primeira etapa

6.3.1.1 Crescimento celular

Pode-se verificar, através da análise da Figura 13, que o crescimento de *Bti* é diretamente proporcional à concentração de manipueira utilizada. Verifica-se uma pequena fase lag até a 3ª hora do processo e uma maior velocidade de crescimento até a 24ª hora. Até a concentração de 175 g/L, a máxima utilizada nesta etapa do trabalho, não foi verificado nenhum efeito inibitório da manipueira sobre o crescimento de *Bti*.

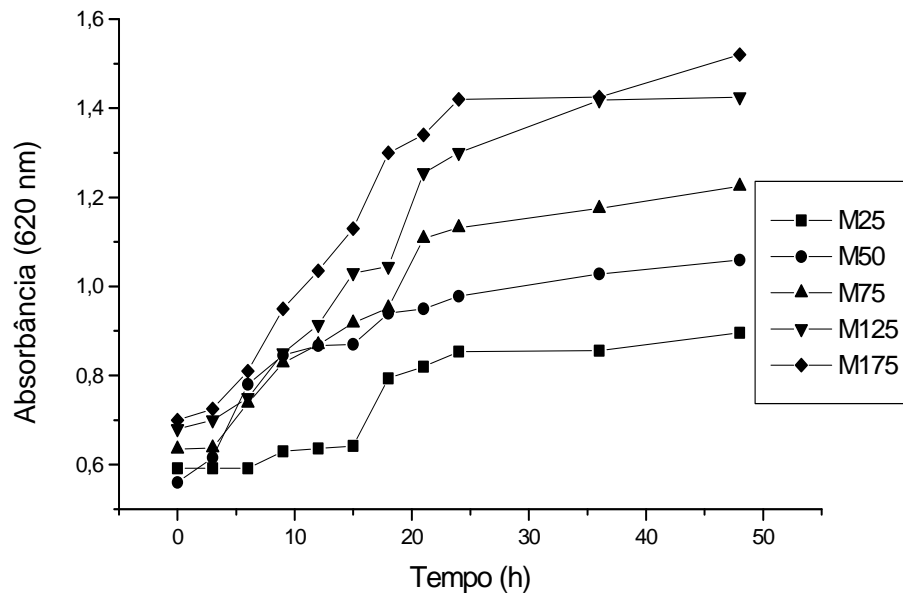


Figura 13 - Crescimento de *Bti* em meios compostos por manipueira nas concentrações de 25, 50, 75, 125 e 175 mL/L.

Os resultados analisados indicaram uma relação direta entre o crescimento e a concentração de manipueira utilizada. Como a manipueira é um resíduo com alto poder poluente e tóxico, os dados obtidos foram promissores, uma vez que indicaram a possibilidade da utilização de um substrato com alta concentração de manipueira, além da não interferência do cianeto (composto existente na manipueira) no processo biológico aeróbio. Assim, optou-se pela continuação da análise da influência da concentração de manipueira, aumentando-se a concentração desta nos meios a serem estudados, além da extensão do tempo do processo fermentativo para uma análise mais efetiva dos resultados.

6.3.1.2 pH

Com relação à variação de pH, verifica-se uma pequena redução em todas as concentrações até cerca de 6 horas do processo fermentativo, a partir da qual há um aumento proporcional destes valores, dependendo da concentração utilizada, até o final do processo, chegando a 8,4 nas concentrações de 125g/L e 175 g/L (Figura 14).

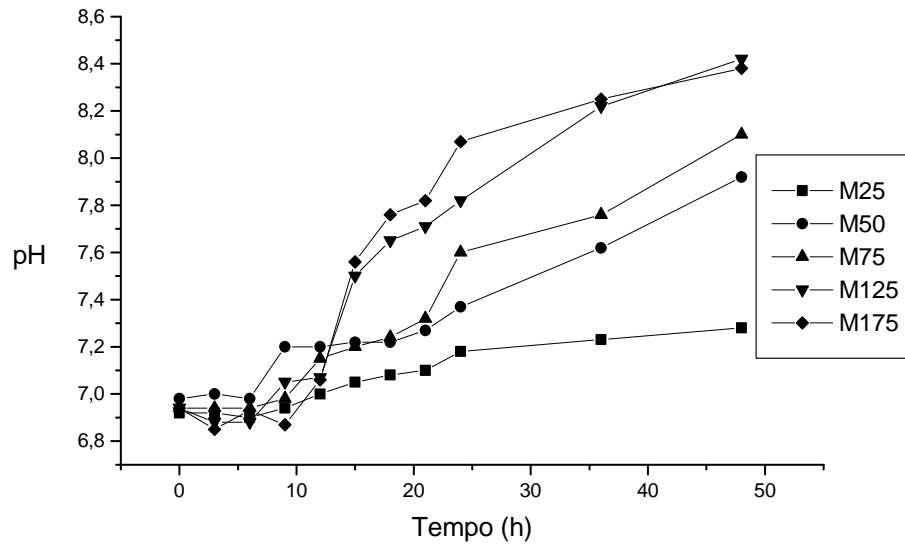


Figura 14 - Variação de pH durante crescimento de *Bti*. em meios compostos por manipueira nas concentrações de 25, 50, 75, 125 e 175 mL/L.

6.3.2 Segunda etapa

6.3.2.1 Crescimento celular

Os dados, a seguir, referem-se às concentrações de 175, 250, 325 e 400 mL/L. O processo fermentativo foi realizado tal como já explicitado no processo anterior, com o diferencial do tempo mais prolongado do processo.

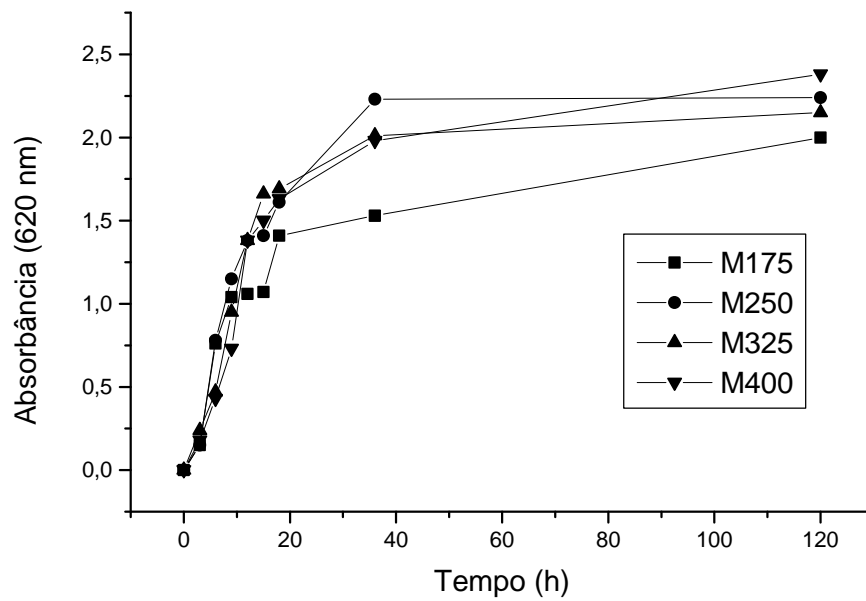


Figura 15 - Crescimento de *Bti* em meios compostos por manipueira nas concentrações de 175, 250, 325 e 400 mL/L.

Através dos resultados obtidos, observa-se que, ao final de 120 horas, continua a ocorrer um crescimento proporcional à concentração de manipueira, porém em menor escala.

6.3.2.2 pH

A Figura 16 demonstra o mesmo comportamento de pH obtido no processo anterior, onde ocorre um declínio até por volta de 6 horas, depois do qual ocorre uma elevação até o final do processo atingindo valores acima de 8,5.

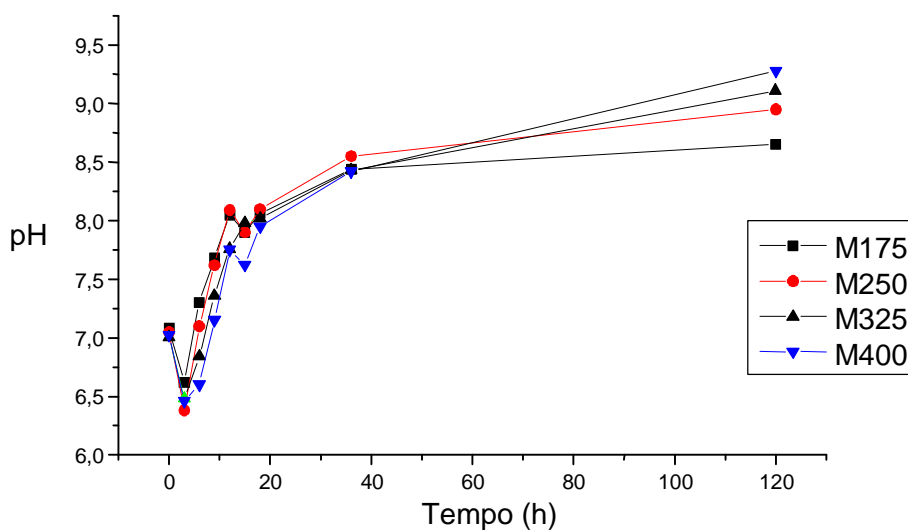


Figura 16 – Variação de pH em meios compostos por manipueira nas concentrações de 175, 250, 325 e 400 mL/L.

Considerando o fato de que a manipueira, na segunda etapa, continuava a apresentar um comportamento crescente com relação ao crescimento celular, optou-se por rastrear o comportamento de *Bti* em concentrações crescentes até a sua forma pura, a saber: 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% de “manipueira”. O procedimento de montagem do processo fermentativo foi semelhante ao experimento anterior, com o diferencial dos parâmetros verificados, os quais, nesta terceira etapa foram ampliados para a análise de produção de esporos, variação da DQO e açúcares redutores, bem como a aplicação de bioensaios.

6.3.3 Terceira etapa

6.3.3.1 Crescimento celular

Com relação ao crescimento celular, da mesma forma que os experimentos anteriores, é diretamente proporcional à concentração de “manipueira” utilizada.

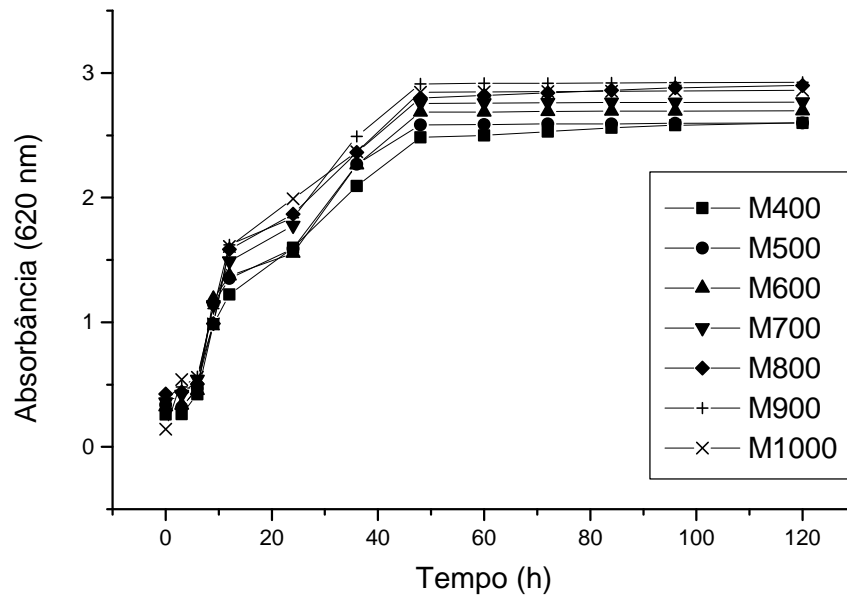


Figura 17 - Crescimento de *Bti* em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L.

6.3.3.2 Determinação da quantidade de esporos

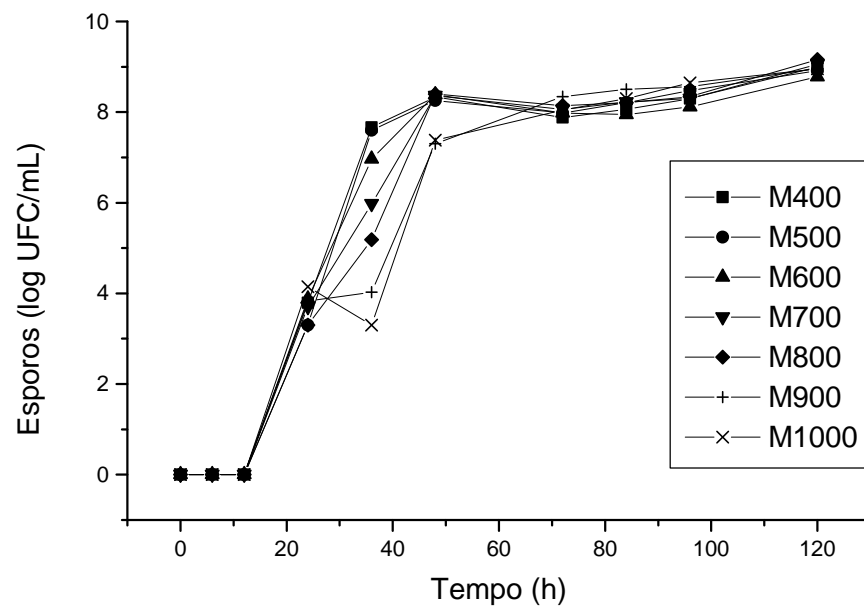


Figura 18– Esporos de *Bti* formados durante processo fermentativo em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L.

Neste estudo, foi observado que, quanto maior a concentração de “manipueira”, mais lenta é a esporulação, o que suscita indicativos de que não seria recomendável o uso de

“manipueira” pura para o objetivo do trabalho. Pela técnica de plaqueamento, foi verificado que em todas as concentrações estudadas se atinge um número similar de esporos por volta de 120 horas do processo fermentativo, da ordem de 10^9 , mas em diferentes tempos de fermentação (Figura 18).

6.3.3.3 Determinação da variação de açúcares redutores

Cereda (1994), salienta que a manipueira apresenta açúcares redutores e um alto teor de matéria orgânica.

Analisando-se a Figura 19, onde é demonstrada a variação do teor de açúcares redutores, observa-se queda após 24 horas do processo, sendo esta mais acentuada entre 36 e 48 horas. Este resultado possivelmente explica a estagnação do crescimento celular, em 48 horas, o que pode ser observado na Figura 16. Nas concentrações de 800, 900 e 1000 mL/L, a quantidade de açúcar, em 48 horas, é maior que nas demais concentrações, igualando-se a estas em 60 horas.

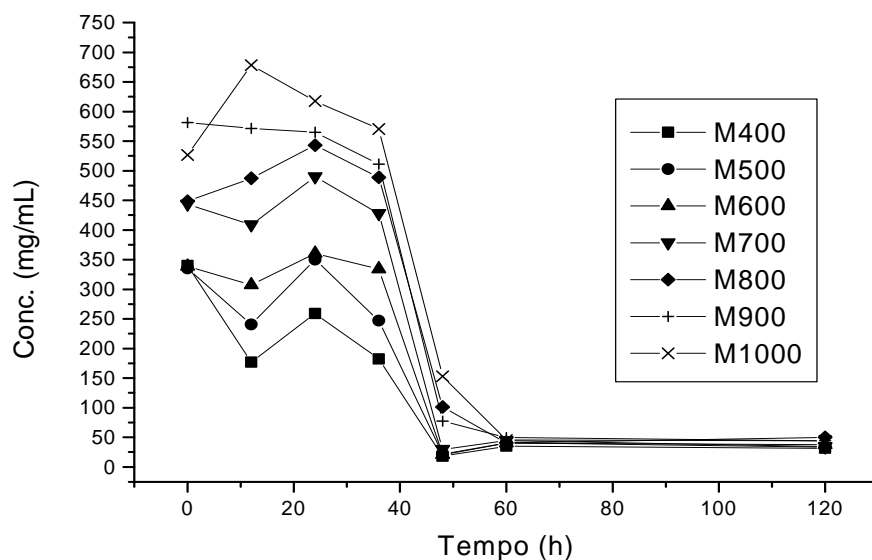


Figura 19 – Variação do teor de açúcares redutores durante crescimento de *Bti* em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L.

6.3.3.4 Determinação da variação da DQO

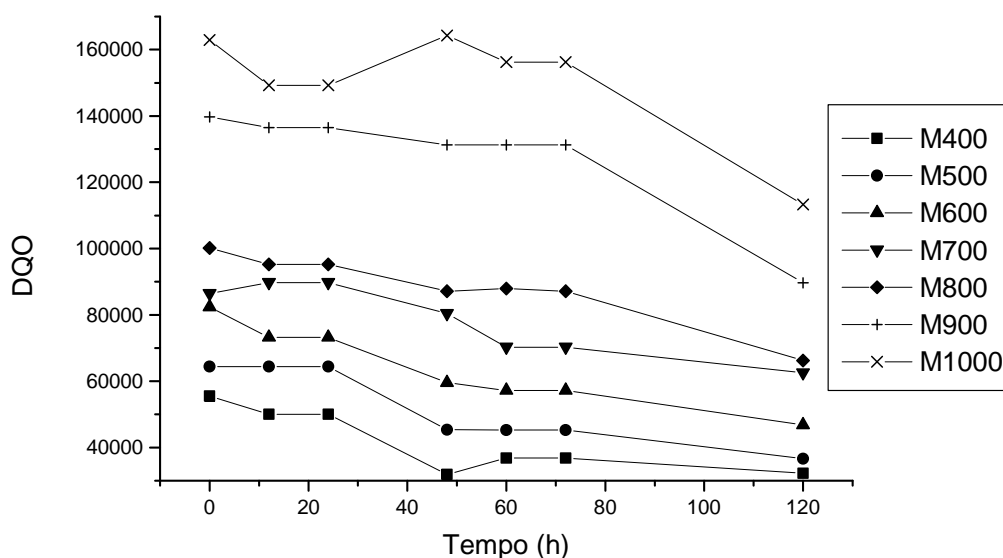


Figura 20 – Variação da DQO durante crescimento de *Bti* em meios compostos por manipueira nas concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L.

Observa-se, analisando a Figura 20, uma redução de DQO de cerca de 42 % para 400 mL/L, 43% para 500 mL/L, 43% para 600 mL/L, 27,6% para 700 mL/L, 34 % para 800 mL/L, 36% para 900 mL/L e 30,5% para 1000 mL/L. Nas concentrações maiores de manipueira, a redução da carga orgânica foi menor.

Embora a redução tenha sido inferior a 50 %, é relevante a redução da carga orgânica para a obtenção de um biocomposto de alto valor agregado.

6.3.3.5 Bioensaios

A Figura 21 refere-se aos dados dos bioensaios realizados com as últimas concentrações utilizadas no processo fermentativo, obtidos no final de 120 horas.

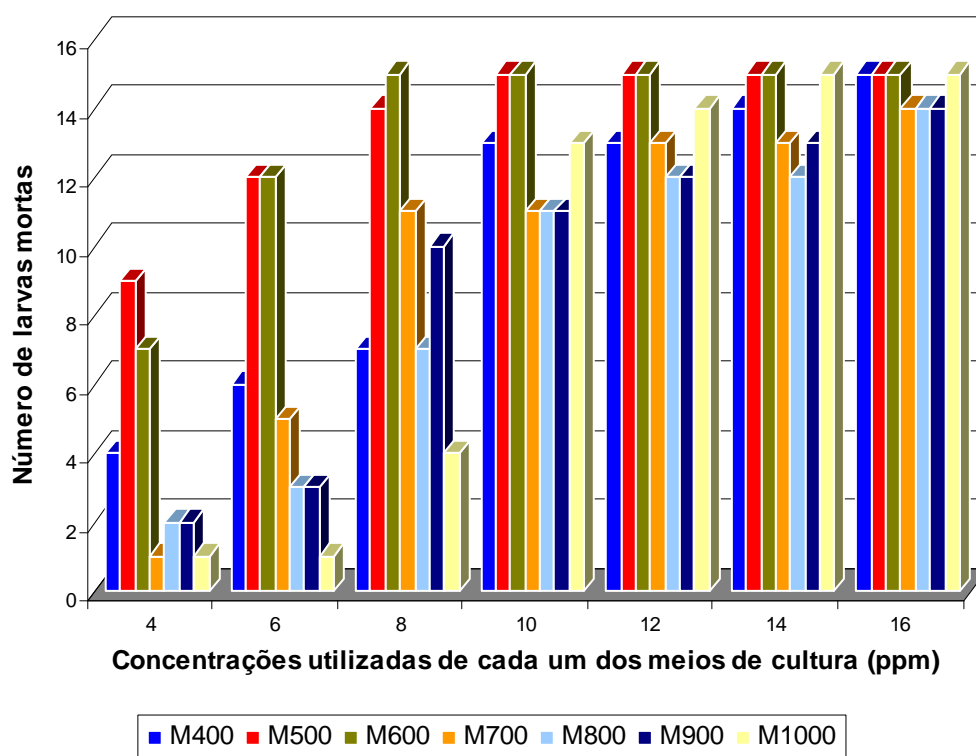


Figura 21 – Número de larvas mortas em cada uma das sete diluições realizadas com as concentrações de 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mL/L.

Observando-se a Figura 21, em que é demonstrada a eficiência de cada meio de cultura nas sete diluições utilizadas, verifica-se que os meios de 500 e 600 mL/L destacaram-se na mortalidade de larvas. Em relação à CL_{50} dos preparados obteve-se o valor de 3,7 ppm para a concentração de 500 mL/L e 4,2 ppm para a de 600 mL/L. As outras concentrações, a saber, 400 mL/L, 700 mL/L, 800 mL/L, 900 mL/L e 1000 mL/L apresentaram CL_{50} de 6,5, 7,2, 8,0, 7,5 e 8,1 ppm, respectivamente (Tabela 5). As concentrações de 800, 900 e 1000 mL/L foram as que apresentaram, portanto, uma menor eficiência.

Tabela 5 – CL_{50} dos meios contendo diferentes concentrações de manipueira.

| <i>Meio testado</i> | M400 | M500 | M600 | M700 | M800 | M900 | M1000 |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <i>CL₅₀ (ppm)</i> | 6,5 | 3,7 | 4,2 | 7,2 | 8,0 | 7,5 | 8,1 |

6.3.3.6 Verificação de esporos e cristais por microscopia

Nas Fotos 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22 observa-se a presença de esporos e cristais em cada uma das concentrações estudadas. Nas lâminas referentes às concentrações de 500 e 600 mL/L pôde-se observar uma maior quantidade de esporos e cristais.

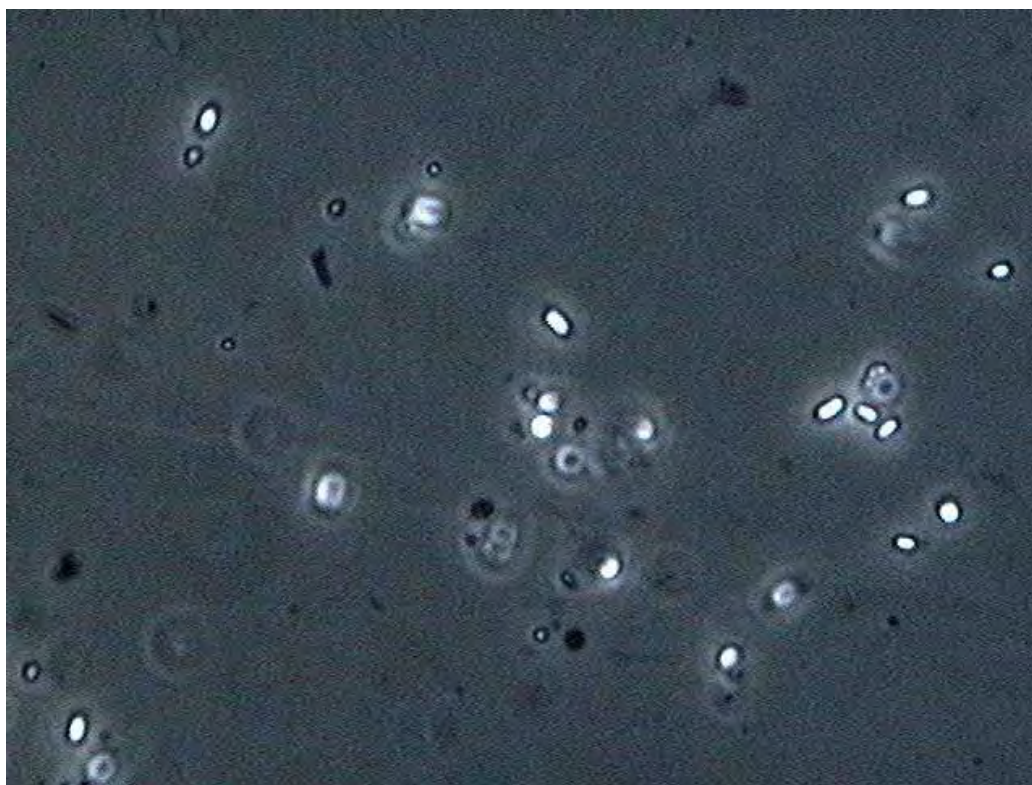


Foto 16 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 40%, em 120 horas do processo fermentativo (M 400).

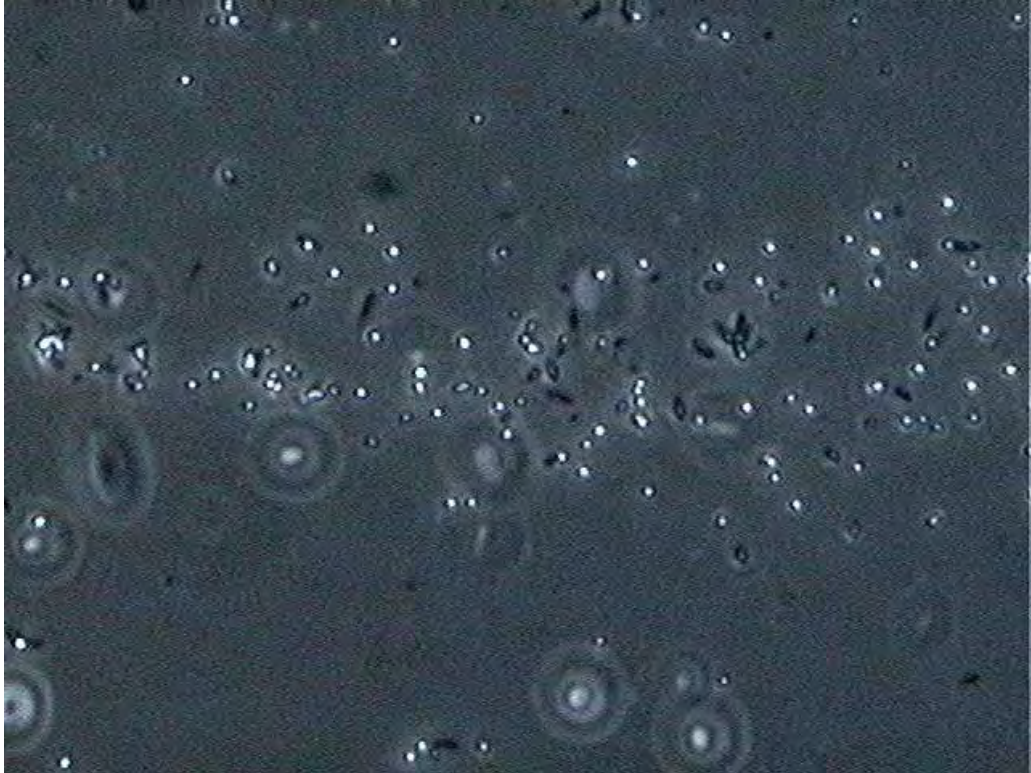


Foto 17 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 50%, em 120 horas do processo fermentativo (M 500).

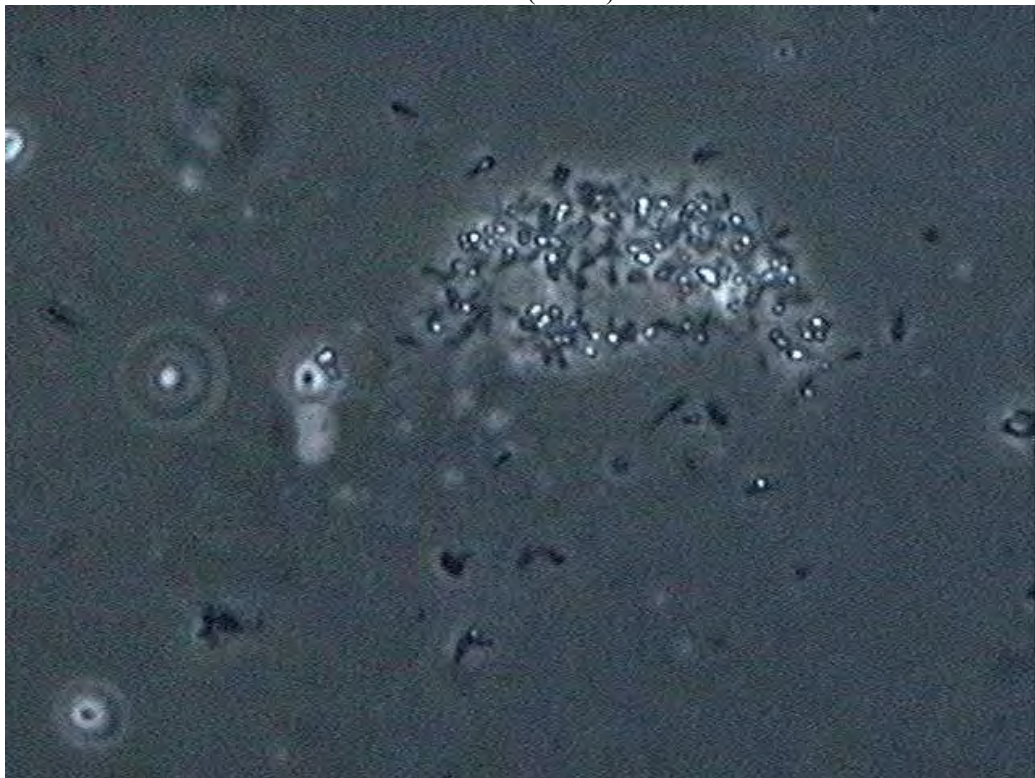


Foto 18 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 60%, em 120 horas do processo fermentativo (M 600).

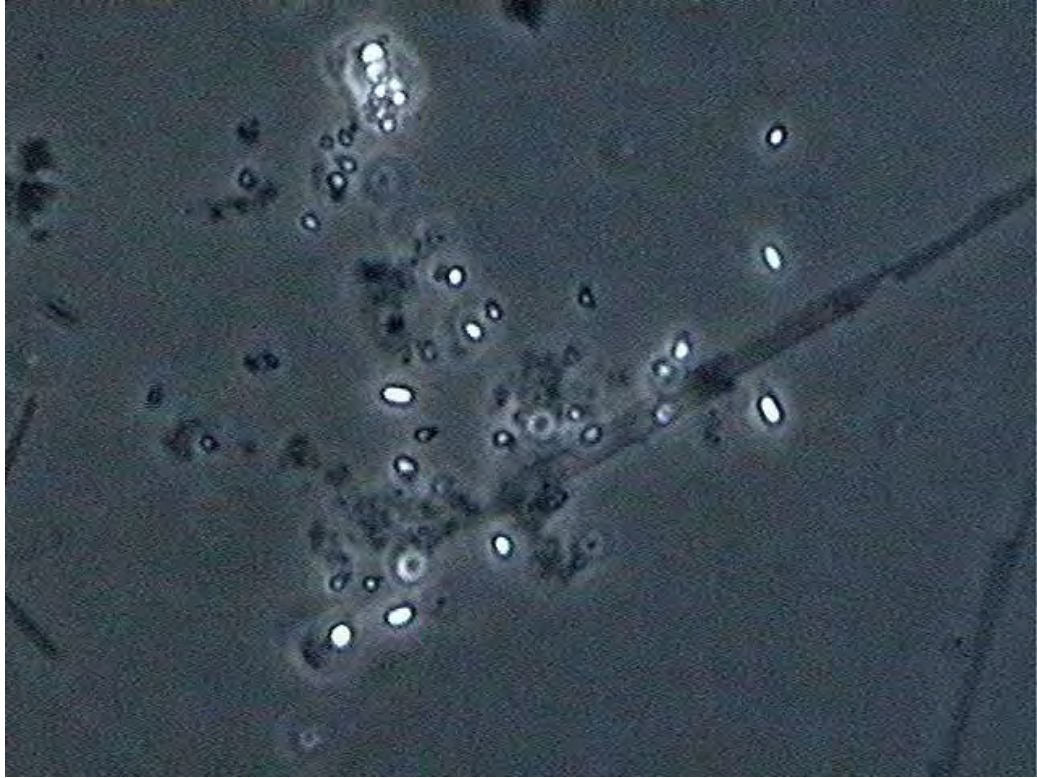


Foto 19 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 70%, em 120 horas do processo fermentativo (M 700).

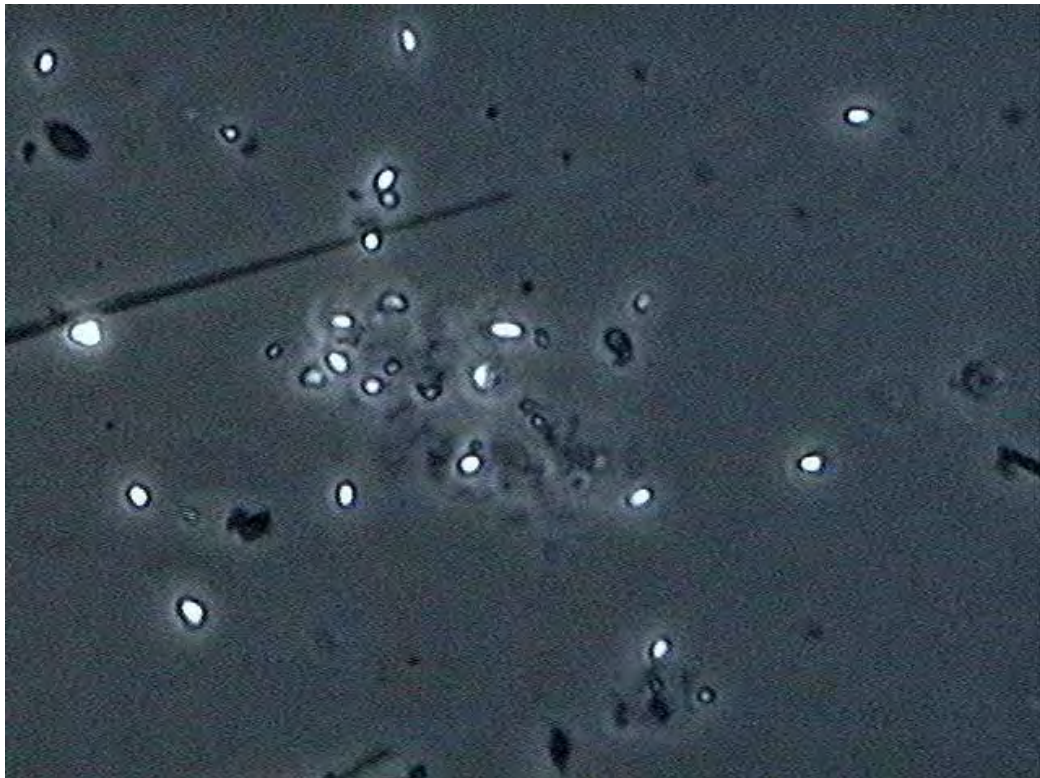


Foto 20 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 80%, em 120 horas do processo fermentativo (M 800).

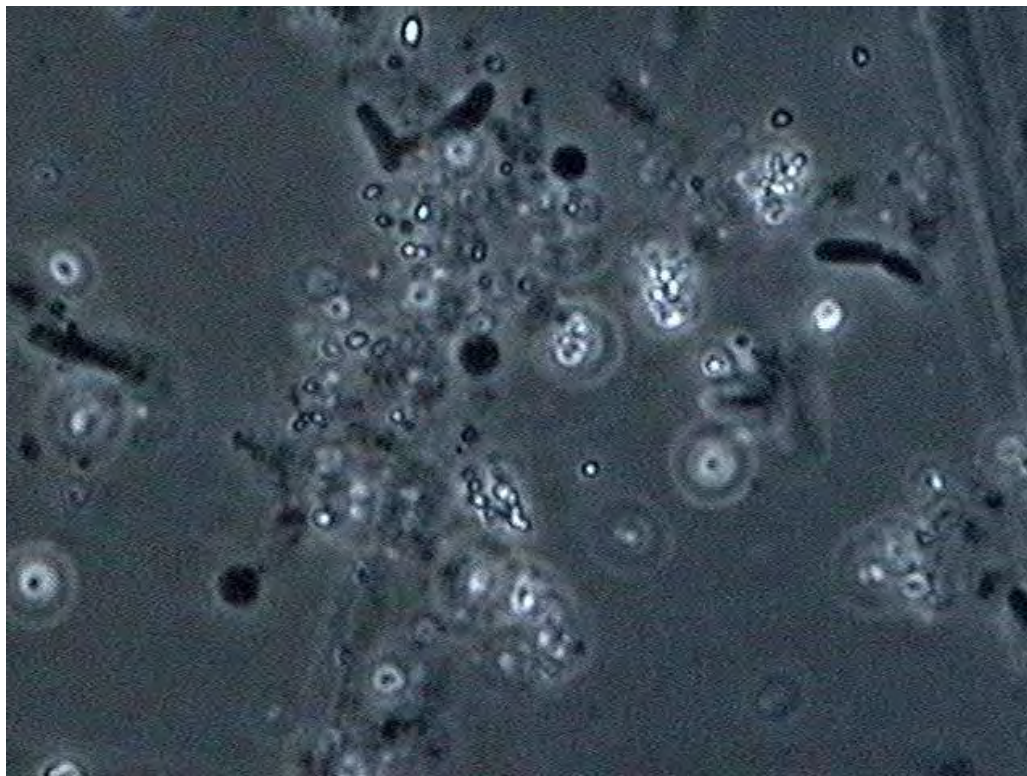


Foto 21 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 90%, em 120 horas do processo fermentativo (M 900).

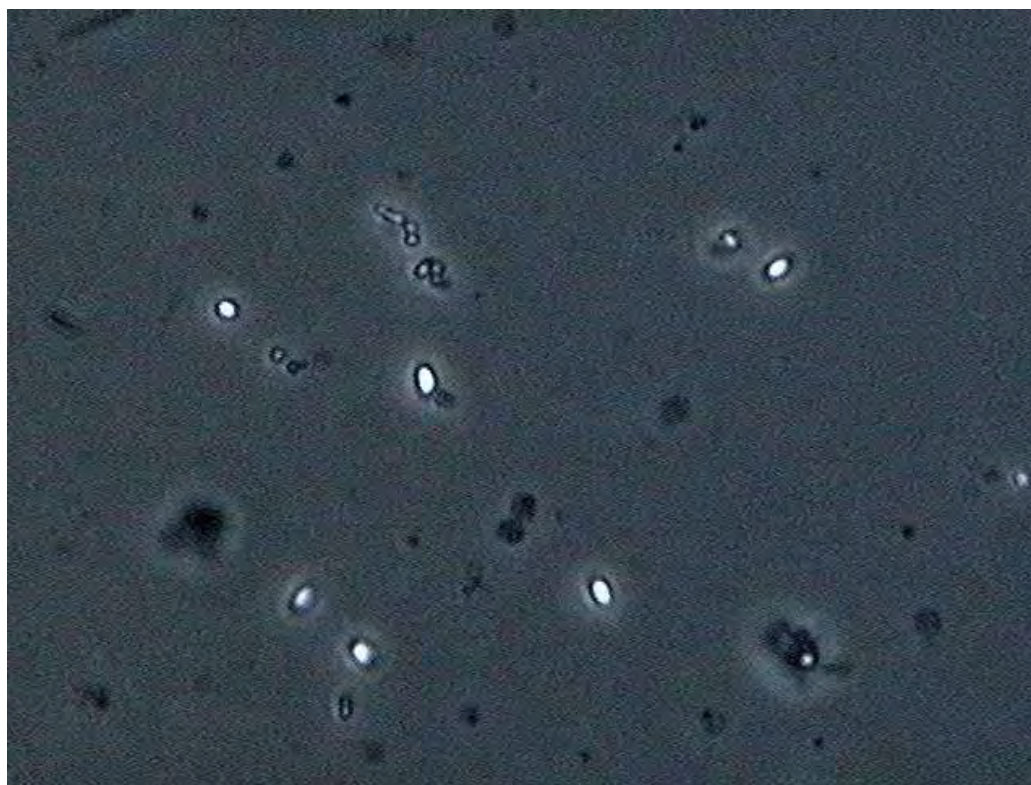


Foto 22 – Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira” 100%, em 120 horas do processo fermentativo (M 1000).

6.4 CONCLUSÃO

A “manipueira” demonstrou ser um excelente meio de cultura para produção de um bioinseticida à base de *Bti*. Embora haja um crescimento celular proporcional à concentração de “manipueira”, a produção de esporos foi similar em todos os casos, ao final do processo, a despeito da menor velocidade de produção dos mesmos nas concentrações mais altas. Em relação à variação da DQO, existe, também, um menor percentual de redução nas concentrações mais altas. Na análise de variação de açúcares redutores, as concentrações mais altas são as que apresentam maior lentidão na redução deste. Ao se analisar os resultados de bioensaios, verificou-se que as melhores concentrações são de 500 e 600 mL/L.

7 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO MANIPUEIRA E PEPTONA COM E SEM A ADIÇÃO DE SAIS MINERAIS E GLICOSE

7.1 INTRODUÇÃO

Faloci et al. (1990) trabalhando com *Bti*, em estudos sobre os efeitos da composição do meio de cultura nos parâmetros de crescimento, produção de δ -endotoxina e suas relações com as propriedades biológicas desta bactéria, estudaram que a substituição de glicose por glicerol como fonte de carbono proporcionou altas concentrações de δ -endotoxina (cristal). Também verificou que, das várias fontes de nitrogênio tradicionais, a Bacto-peptona, o extrato de carne, a triptona e a peptona de carne proporcionaram uma quantidade significativamente maior de proteínas quando comparados com o extrato de levedo ou casaminoácidos (aminoácidos livres).

O presente trabalho teve como objetivo a comparação de meios de cultura, tradicional, à base de peptona, com glicose e solução basal de sais ou complementada com estas substâncias, separadamente e um alternativo, à base de manipueira, também complementada com glicose e solução basal de sais da mesma forma como descrito para a peptona, visando a análise do processo relativa ao crescimento celular, monitorado por densidade óptica, à efetividade contra larvas de *Ae. aegypti*, pela estimativa da CL_{50} e à produção de esporos, através do plaqueamento em agar nutriente e visualização por microscopia.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Preparo do inóculo e fermentação

Foram preparados 6 tipos de meios: 3 com uma fonte de nitrogênio tradicional, peptona e outros 3 sem a peptona, porém com “manipueira”. Dois dos 6 meios foram complementados com solução basal de sais e glicose, outros 2 com glicose e os últimos 2, com solução basal de sais. O meio de “manipueira” foi preparado com este resíduo na concentração de 175 mL/L e o meio de peptona, com esta fonte de nitrogênio na concentração de 4 g/L. Quando a glicose foi adicionada, fez-se a 8 g/L. A solução basal de sais foi composta por: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L; KH_2PO_4 , 3 g/L e K_2HPO_4 , 3 g/L. Os meios preparados tiveram o pH ajustado para 7,0, antes da autoclavagem. O processo fermentativo teve duração de 120 horas. Foi realizada pré-fermentação, por 15 horas, com cada um dos meios de fermentação. O inóculo da fermentação consistiu em 5 mL do pré-inóculo em 250 mL de cada um dos meios de cultura estudados.

7.2.2 Parâmetros acompanhados

Neste experimento foram averiguados o crescimento celular, por densidade óptica, o surgimento de esporos e cristais, por microscopia, a quantificação de esporos, por plaqueamento em ágar-nutriente e a CL_{50} , através dos bioensaios com *Ae. aegypti*.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Crescimento celular

A Figura 22 representa o crescimento celular nos meios testados*.

* P+S+G, lê-se Peptona, glicose e sais; P+G, lê-se Peptona e glicose; P+S, lê-se Peptona e sais.
M+S+G, lê-se Manipueira, glicose e sais; M+G, lê-se manipueira e glicose; M+S, lê-se Manipueira e sais.

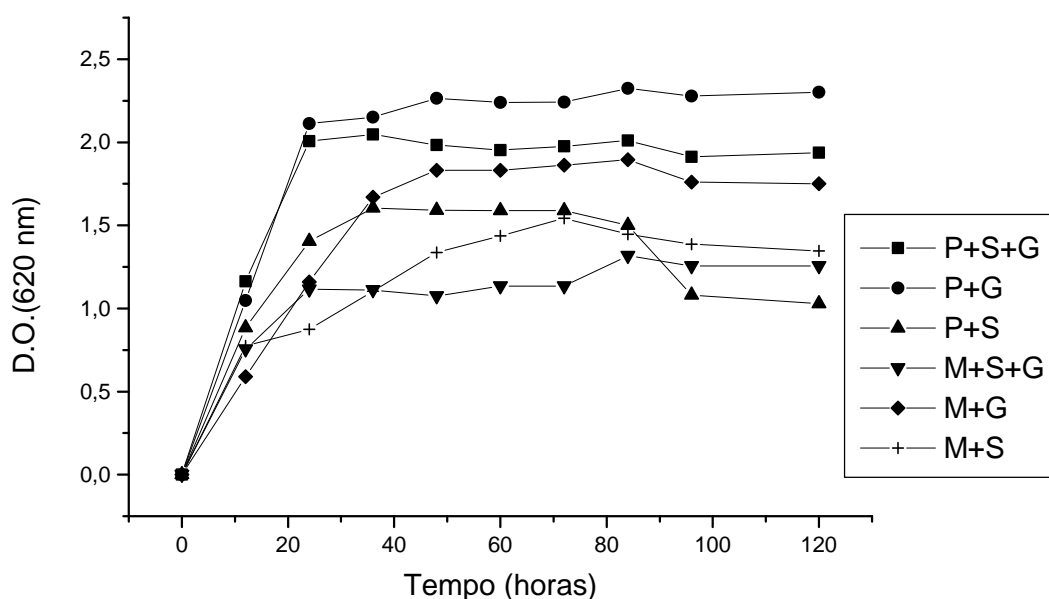


Figura 22 – Crescimento de *Bti* em meios compostos por manipueira e peptona complementados com glicose e/ou solução salina

Analisando-se a Figura 22, observa-se que, em geral, os meios contendo a peptona apresentam uma maior eficiência. O meio P+G obteve o maior valor de DO ao final do processo, seguido deste meio com sais e glicose. Entre os meios à base de manipueira, o M+G, da mesma forma que o de peptona, obteve o maior valor de DO. O meio M+S+G, juntamente com o M+S, obtiveram padrões próximos de crescimento, porém obtiveram valores baixos de DO.

7.3.2 Produção de esporos e cristais

Com relação ao plaqueamento para quantificação de esporos, o meio P+S obteve o maior rendimento (Tabela 6). Em contraposição, o meio P+G obteve poucos esporos, o que pôde ser evidenciado também por microscopia, onde não se visualizou formação de esporos e cristais (Foto 26), comparado aos outros meios (Fotos 23, 24, 25, 27 e 28). Sobre este mesmo meio,

mesmo utilizando-se grande quantidade de produto, não se chegou a um resultado satisfatório de CL₅₀, quando se compara com os outros meios (Tabela 6).

Apesar de não ser o meio com maior produção de esporos, o meio M+S obteve a menor CL₅₀ e, portanto, a maior eficácia contra larvas de *Ae. aegypti*.

Tabela 6 - CL₅₀ e produção de esporos nos meios de peptona e manipueira suplementados com sais e/ou glicose.

| Meios testados | CL 50 (ppm) | Esporos (UFC/mL) |
|-----------------------|--------------------|-----------------------------|
| P+S+G | 15,2 | 1×10^8 |
| P+G | 1330 | 4×10^3 |
| P+S | 16,2 | $1,8 \times 10^8$ |
| M+S+G | 39,2 | 6×10^7 |
| M+G | 16,2 | 8×10^7 |
| M+S | 8,95 | $8,66 \times 10^7$ |

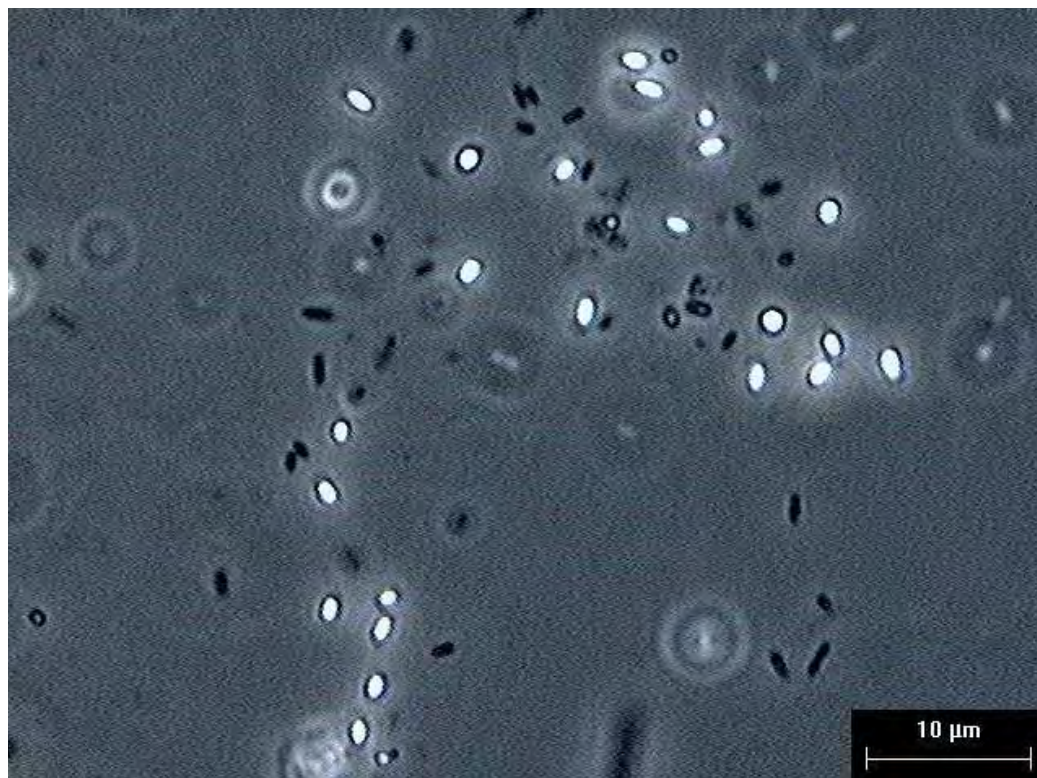


Foto 23 -Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira”, na concentração de 175 mL/L e glicose, na concentração de 8 g/L, em 120 horas do processo fermentativo (M+G).

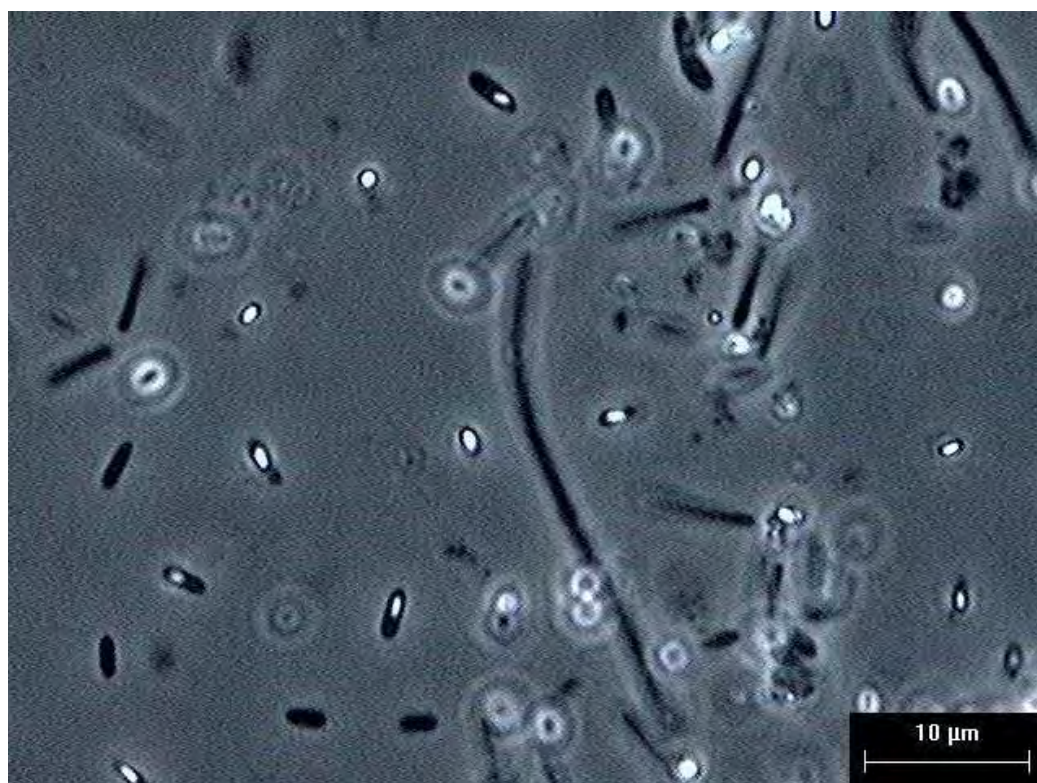


Foto 24 -Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira”, na concentração de 175 mL/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (M+S).

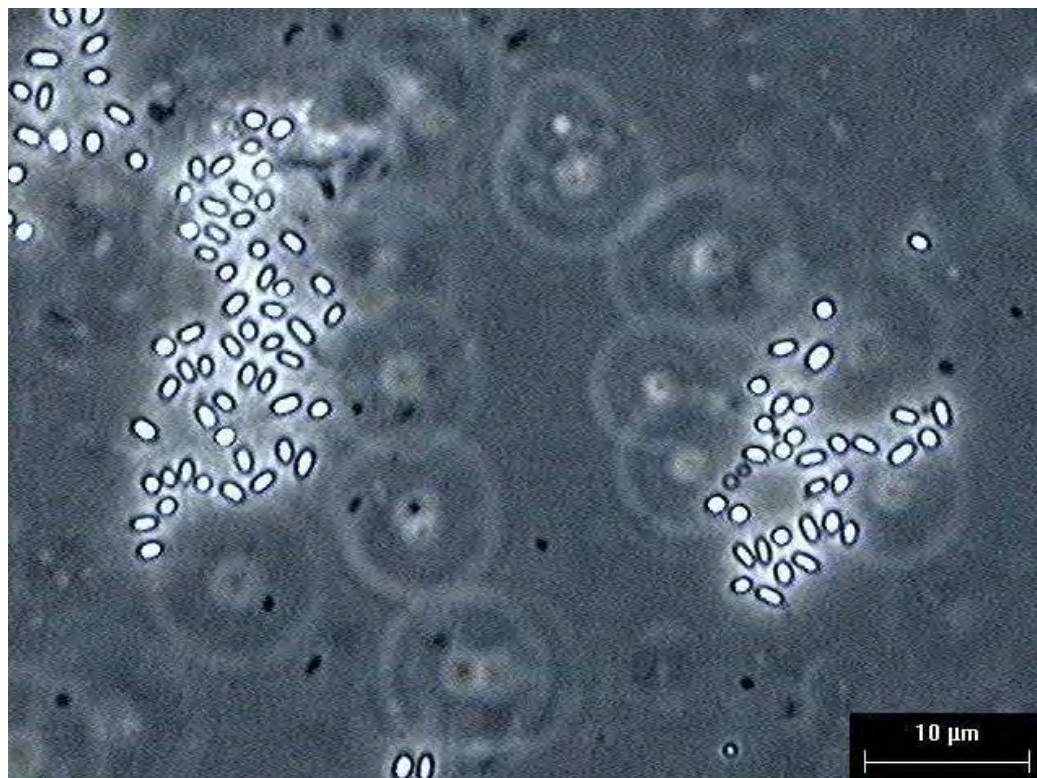


Foto 25 - Visualização de esporos e cristais em meio de “manipueira”, na concentração de 175 mL/L, glicose, na concentração de 8 g/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (M+S+G).



Foto 26 - Visualização de células vegetativas em meio de peptona, na concentração de 4 g/L e glicose, na concentração de 8 g/L, em 120 horas do processo fermentativo (P+ G).

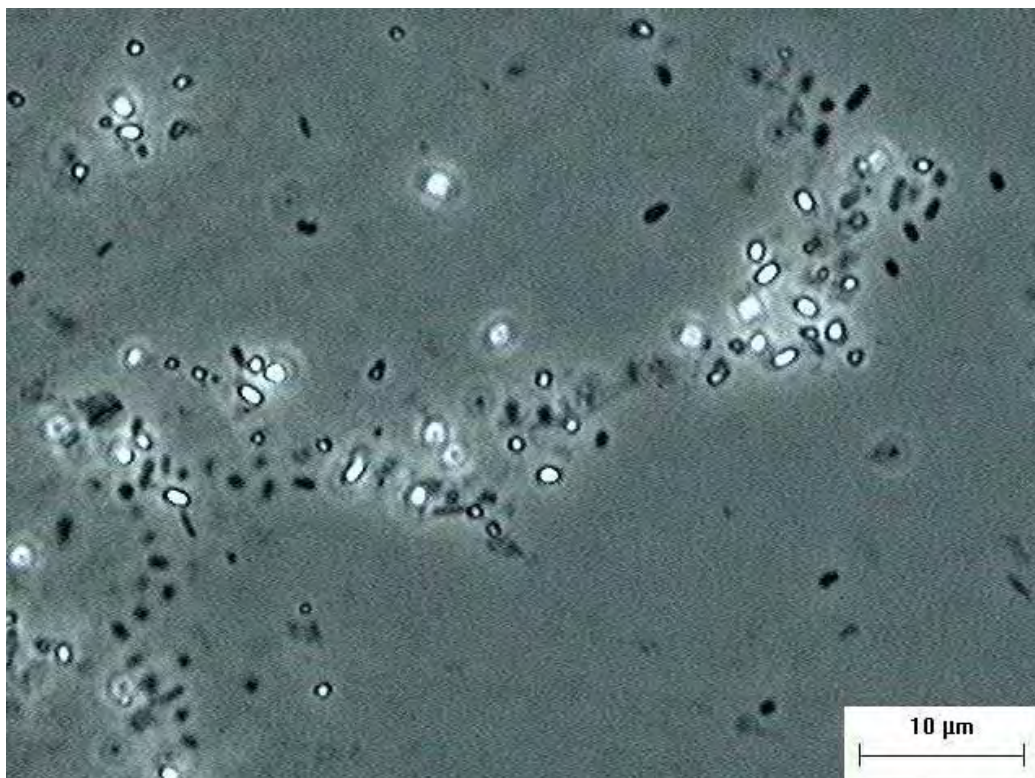


Foto 27 -Visualização de esporos e cristais em meio de peptona, na concentração de 4 g/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (P+ S).

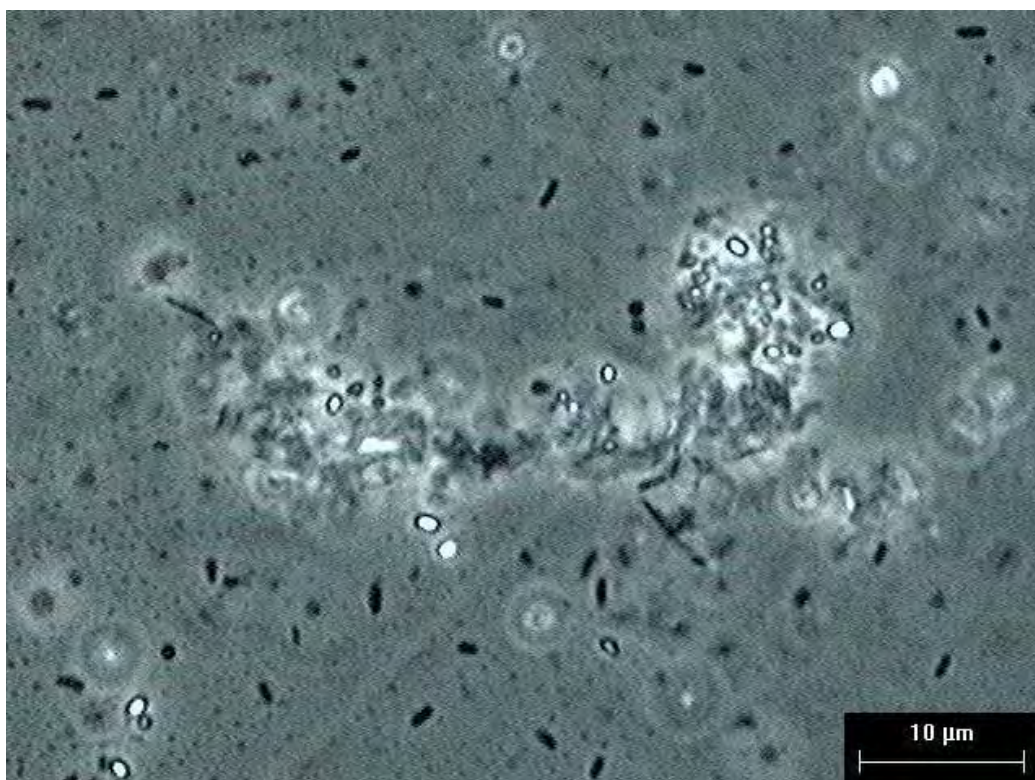


Foto 28 -Visualização de esporos e cristais em meio de peptona, na concentração de 4 g/L, glicose, na concentração de 8 g/L e solução basal de sais, em 120 horas do processo fermentativo (P+ S+ G).

7.4 CONCLUSÃO

A adição de solução basal de sais, tanto para o meio à base de “manipueira”, quanto para o meio à base de peptona proporcionou maior eficácia em relação à potência do bioinseticida. Entretanto, pode-se dizer que em meio à base de peptona esta adição é necessária e para o meio à base de “manipueira”, é apenas recomendável, visto que não altera grandemente a produção de esporos e a CL_{50} . Pela pouca diferença encontrada, a manipueira, substrato obtido sem custos, permite antever uma nova perspectiva na produção desse bioinseticida. Visto que a manipueira se constitui resíduo abundante e, através dos resultados, mostrou-se bastante eficaz como meio de cultura, visualiza-se a possibilidade de utilização desse resíduo na produção do bioinseticida, sobretudo quando se considera a crítica situação da saúde pública brasileira, com numerosos casos de dengue espalhados por todo o país, necessitando-se, rapidamente, de formas alternativas no controle dos mosquitos vetores.

8 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO MANIPUEIRA ESTÉRIL E NÃO ESTÉRIL NA CONCENTRAÇÃO DE 400 mL/L E NA SUA FORMA PURA

8.1 INTRODUÇÃO

Segundo Cereda (1994), a manipueira é de aspecto leitoso, contendo de 5 a 7% de fécula, proteínas, glicose, restos de células, ácido cianídrico, bem como outras substâncias orgânicas e nutrientes minerais essenciais. Considerando que no processo de autoclavagem pode haver a degradação do cianeto presente no líquido in natura, conferindo maiores possibilidades de crescimento ao microrganismo, optou-se pela realização de experimentos com a manipueira estéril, submetida ao processo de autoclavagem e com a não estéril, contendo maior quantidade de cianeto. Como já se observara a proporcionalidade entre a concentração de manipueira e o crescimento celular, comparou-se, neste mesmo experimento, a concentração de 400 mL/L, na sua forma estéril e não estéril, com a concentração máxima, ou seja, o meio contendo a manipueira na sua forma pura, também na forma estéril e não estéril.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Preparo do inóculo e fermentação

Quatro meios de cultura foram preparados. Dois deles consistiam em manipueira pura e os outros em manipueira na concentração de 400 mL/L. Em cada um dos tipos, um foi submetido ao processo de autoclavagem e o outro não.

As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura, acondicionados em agitador-incubador, a 180 r.p.m. e 28°C, com tempo de duração de 96 horas.

Foi realizada uma pré-fermentação com duração de 15 horas, sendo o inóculo três alçadas do microorganismo retiradas diretamente do tubo de manutenção. Os meios da pré-fermentação foram os mesmos da fermentação. O inóculo da fermentação consistiu em 5mL do pré-fermentado.

8.2.2 Parâmetros acompanhados

Neste experimento foram averiguados o crescimento celular, por densidade óptica, o surgimento de esporos e cristais, por microscopia, a quantificação de esporos, por plaqueamento em ágar nutriente, a CL_{50} , através de bioensaios com *Ae. aegypti* e a determinação da variação da DQO.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.3.1 Crescimento celular

A Figura 23 representa os resultados de crescimento do *Bti* em meios compostos por manipueira pura (M1000) e na concentração de 40% (M400), na sua forma estéril (ME) e não estéril (MS):

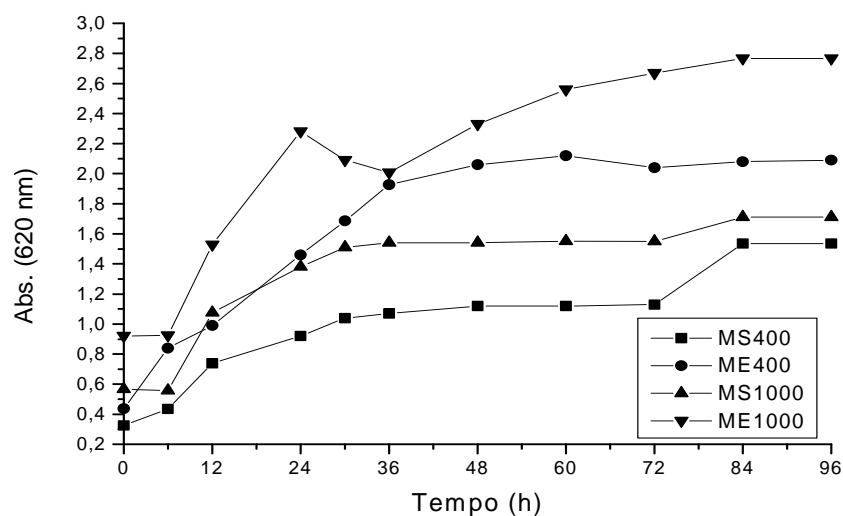


Figura 23 - Crescimento de *Bti* em meios de cultura compostos por manipeira 40% e pura, nas formas estéril e não estéril.

Na Figura 23, observa-se um crescimento maior nos meios estéreis. Provavelmente, o processo de esterilização elimina possíveis contaminantes que estariam competindo com o *Bti* por sua sobrevivência e dificultando o crescimento da bactéria. A manipeira, na sua forma pura, por acumular uma maior quantidade de nutrientes, permitiu o melhor rendimento.

8.3.2 Determinação da quantidade de esporos

A Figura 24 representa a produção de esporos nos meios estudados:

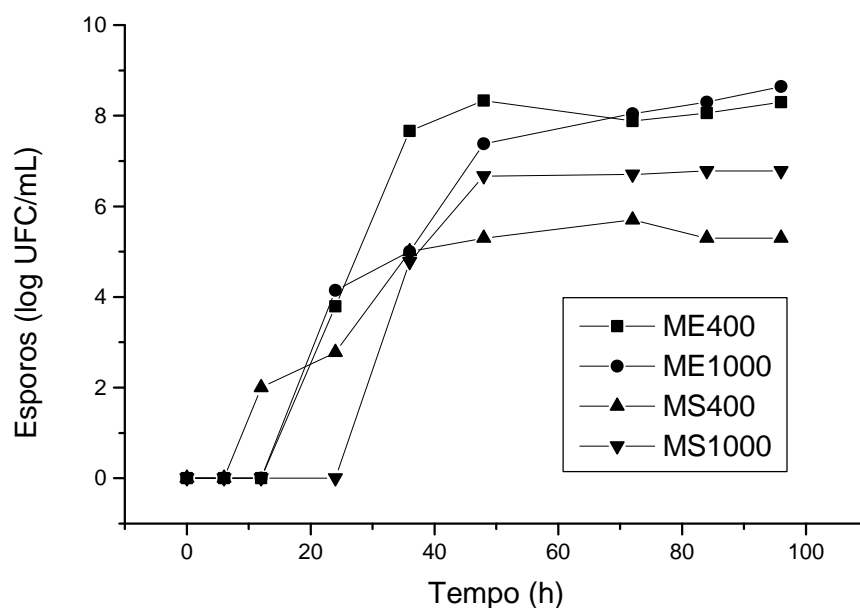


Figura 24 – Produção de esporos de *Bti* em meios de cultura compostos por manipueira 40% e pura, nas formas estéril e não estéril.

Na forma estéril, a produção de esporos é similar em ambas as concentrações, porém na forma pura, esta é mais lenta. Com relação aos meios não estéreis, a produção de esporos é menor comparada aos meios estéreis e é diretamente proporcional à concentração de “manipueira”.

8.3.3 Determinação da variação da DQO

Observa-se, na Figura 25, que existe uma redução da DQO de cerca de 28%, 22%, 22% e 37% para MS1000, ME1000, MS400 e ME400, respectivamente. No meio com alta concentração de manipueira pode ter havido uma inibição pela concentração do substrato. Em meios com manipueira 40%, observa-se que em meio estéril houve maior diminuição da DQO, o que pode ser ocasionado pela hidrólise de alguns compostos que se tornaram facilmente assimiláveis pelo processo de esterilização.

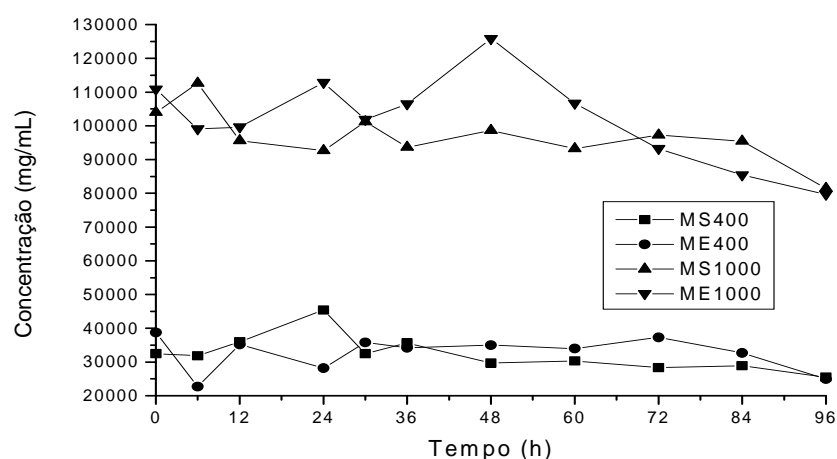


Figura 25 - Redução da DQO durante crescimento de *Bti* em meios de cultura compostos por manípueira 40% e pura, nas formas estéril e não estéril.

8.3.4 Bioensaios

A Tabela 7 representa dados oriundos de bioensaios com larvas de *Aedes aegypti*.

Tabela 7 – CL_{50} dos meios testados contendo manípueira estéril e sem esterilização em duas diferentes concentrações.

| <i>Meios testados</i> | <i>CL 50 (ppm)</i> |
|-----------------------|--------------------|
| ME 400 | 6,5 |
| ME 1000 | 8,1 |
| MS 400 | 24,20 |
| MS 1000 | 41,07 |

É possível verificar, nesta Tabela, que os meios não estéreis apresentam CL_{50} bastante elevadas, quando comparadas às dos meios estéreis. Nos meios mais concentrados, independentes da esterilização, as CL_{50} são maiores.

8.3.5 Verificação de esporos e cristais por microscopia

As Fotos 29 e 30 são referentes aos meios MS 400 e MS 1000.

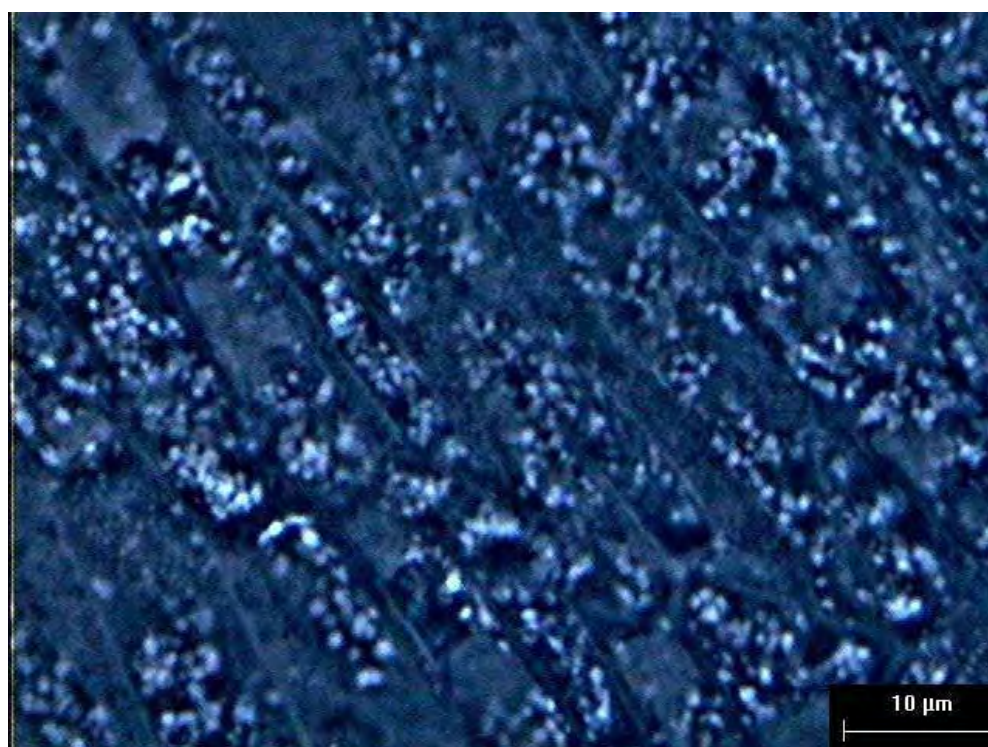


Foto 29 -Contaminante (hifa) em meio de “manipueira” 40%, sem esterilização (MS 400).

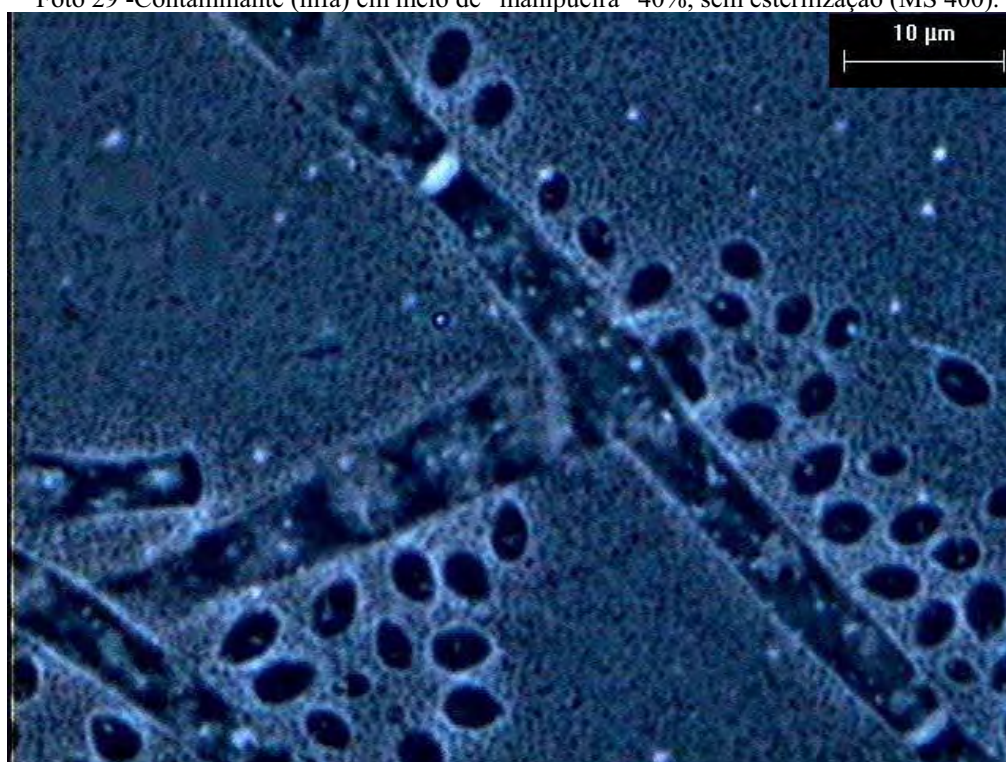


Foto 30 - Contaminante (hifas) em meio de manipueira 100%, sem esterilização (MS 1000).

Analisando-se estas Fotos, podem-se evidenciar contaminações, tais como fungos, o que pode ser verificado pelas hifas presentes.

8.4 CONCLUSÃO

Como já delineado anteriormente, teve-se como objetivo, neste trabalho, verificar a influência que a esterilização do meio de cultura exerce sobre o crescimento do microrganismo. Em todos os parâmetros analisados, observa-se que os meios esterilizados possuem melhor eficácia. Os meios sem esterilização, não só devido à presença do cianeto, mas, certamente pela presença de contaminantes, não exibiram bons resultados.

Tem-se, então, que a esterilização, apesar de acrescentar um maior tempo ao processo fermentativo, mesmo com a elevação do custo da produção, é indispensável.

9 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS UTILIZANDO RESÍDUOS DE ABATEDOUROS E FARINHEIRAS

9.1 INTRODUÇÃO

Uma das dificuldades para a adoção do controle microbiano, no Brasil, é o custo de produção do bioinseticida, no que se relaciona ao meio de cultura empregado.

Sabe-se que, o sangue recolhido por ocasião do abate dos animais nos matadouros constitui um resíduo de elevado valor nutritivo, sobretudo em virtude de suas proteínas, ricas em ácidos aminados essenciais, vitaminas e sais minerais (PARDI, 1994).

Em Hyun et al. (1998) utilizaram plasma bovino advindo do processo de abate para a produção econômica de *Lactobacillus* sp., uma linhagem probiótica, obtendo-se excelentes resultados e consagrando o sangue de abatedouros como um resíduo promissor para a produção de bioprodutos.

Ernandes (1998) utilizou sangue de aves e suínos para o crescimento de *Bacillus thuringiensis* em fermentação submersa e salientou a dificuldade em se usar este substrato na sua forma líquida, pois coagula face a qualquer tipo de esterilização por calor úmido.

Hertlein et. al (1981) destacaram o uso da “tindalização” como alternativa de esterilização de resíduos protéicos que não podem ser submetidos a altas temperaturas, como no processo de autoclavagem.

Segundo Purita (1924) a tindalização é o processo de esterilização por aquecimento descontínuo proposto por Tyndall em 1877 e que consiste em repetir quatro ou cinco vezes, com o intervalo de 24 horas, a esterilização a 58 °C no esterilizador de Koch ou na autoclave de Chamberland, na pressão normal. Este processo é baseado no fato de que a maioria dos microrganismos, em sua forma vegetativa, morre rapidamente a 58 °C, enquanto, na forma

esporulada, resiste àquela temperatura. Os esporos, porém, em temperatura favorável, germinam rapidamente, de modo que 24 horas depois se encontram na forma vegetativa e um novo aquecimento os mata. Repetida esta operação 4 ou 5 dias consecutivos, tem-se a certeza de que todos os esporos existentes no líquido germinaram e que todos os microrganismos resultantes desta germinação foram destruídos e que, portanto, o líquido ficou perfeitamente estéril. Barzizza e Manso Soto (1956) ainda salientam que a tindalização é especialmente utilizada quando as substâncias a serem esterilizadas podem decompor-se a temperaturas elevadas, como o soro sanguíneo, que se coagula a 65°C.

Este estudo visou a verificação da eficácia do resíduo de farinha (manipueira) e do sangue de abatedouros como substratos potenciais em fermentação submersa para produção de bioinseticida à base de *Bti*.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1 Preparo do inóculo e fermentação

As fermentações, com duração de 120 horas, foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 250 mL de meio de cultura. Dois tipos de meios, um contendo 90% de manipueira e 10 % de sangue e o outro, contendo 70 % de manipueira e 20 % de sangue*, foram testados na forma não estéril e na forma estéril, pelo processo de tindalização.

O inóculo consistiu em 5 mL do meio de pré-fermentação (o mesmo meio da fermentação, inoculado com suspensão preparada através de 3 alçadas da colônia cultivada do

* Meio com 90% de manipueira e 10% de sangue: 90M10S
Meio com 90% de manipueira e 10% de sangue tindalizado: 90M10ST
Meio com 70% de manipueira e 20% de sangue: 70M20S
Meio com 70% de manipueira e 20% de sangue tindalizado: 70M20ST

Bti, dispersas em tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada e, então, mantida sob agitação a 180 r.p.m, 28° C, durante 15 horas).

9.2.2 Parâmetros acompanhados

Neste experimento foram averiguados o crescimento celular, por densidade óptica, o surgimento de esporos e cristais, por microscopia, a quantificação de esporos, por plaqueamento em ágar nutriente e a CL_{50} , através de bioensaios com *Ae. aegypti*.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.3.1 Crescimento celular

A Figura 26 representa o crescimento da bactéria nos meios em questão.

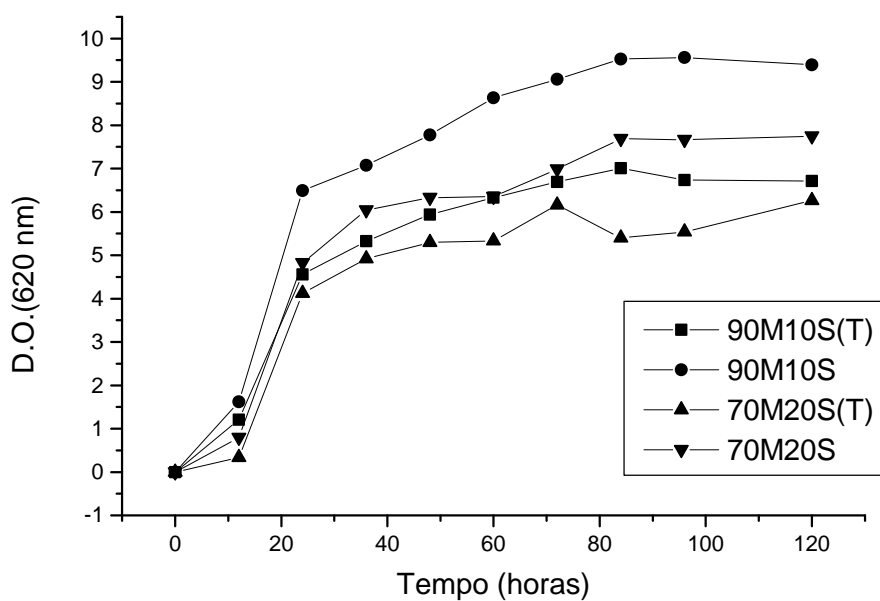


Figura 26 - Crescimento de *Bti* em meios de cultura compostos por resíduos de abatedouros, tinalizados ou não e farinheiras.

Tabela 8 – CL₅₀ e número de esporos nos meios à base de manipueira e sangue.

| <i>Meios testados</i> | <i>CL₅₀ (ppm)</i> | <i>Esporos (UFC/mL)</i> |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 90M10S(T) | 3 | 1,4 x 10 ⁸ |
| 90M10S | 5 | 7,3 x 10 ⁷ |
| 70M20S(T) | 3 | 2 x 10 ⁸ |
| 70M20S | 20 | 8,6 x 10 ⁷ |

Ao se realizar a leitura no espectrofotômetro, como já descrito na metodologia, fez-se 3 lavagens com água, a fim de descartar qualquer resquício de meio de cultura que pudesse alterar a turbidez gerada apenas pelas células formadas. O fato é que, o sangue possui uma homogeneidade aparente, pois possui 2 fases: o plasma e os glóbulos sanguíneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990). Apesar das lavagens, muito da coloração avermelhada ainda persistia, como consequência da lise de hemáceas e extravasamento da hemoglobina. Foi, então, realizada, uma leitura do meio puro e aferido o valor, a fim de se descontar esta influência nos resultados subsequentes e obter-se o valor exato em relação às células formadas.

Analisando-se a Figura 26, observa-se que nos meios contendo o sangue sem processo de tinalização, os resultados foram superiores comparados aos daqueles contendo o sangue submetido ao processo. O mesmo ocorre nos meios contendo uma maior quantidade de manipueira (90%). Em contrapartida, ao se analisar os resultados do número de esporos formados ao final do processo, bem como a CL₅₀, através de bioensaios, o maior número de esporos e a menor CL₅₀ obtidos são referentes aos meios contendo o sangue tinalizado (Tabela 7).

Nas Fotos 31, 32, 33 e 34 representando imagens de microscopia, ao final de 120 horas, em cada um dos meios analisados, quase não se observam cristais, apenas esporos. Podem-se observar, também, restos de hemácias e bastonetes contaminantes, principalmente nos meios 70M20S e 70 M20S (T).

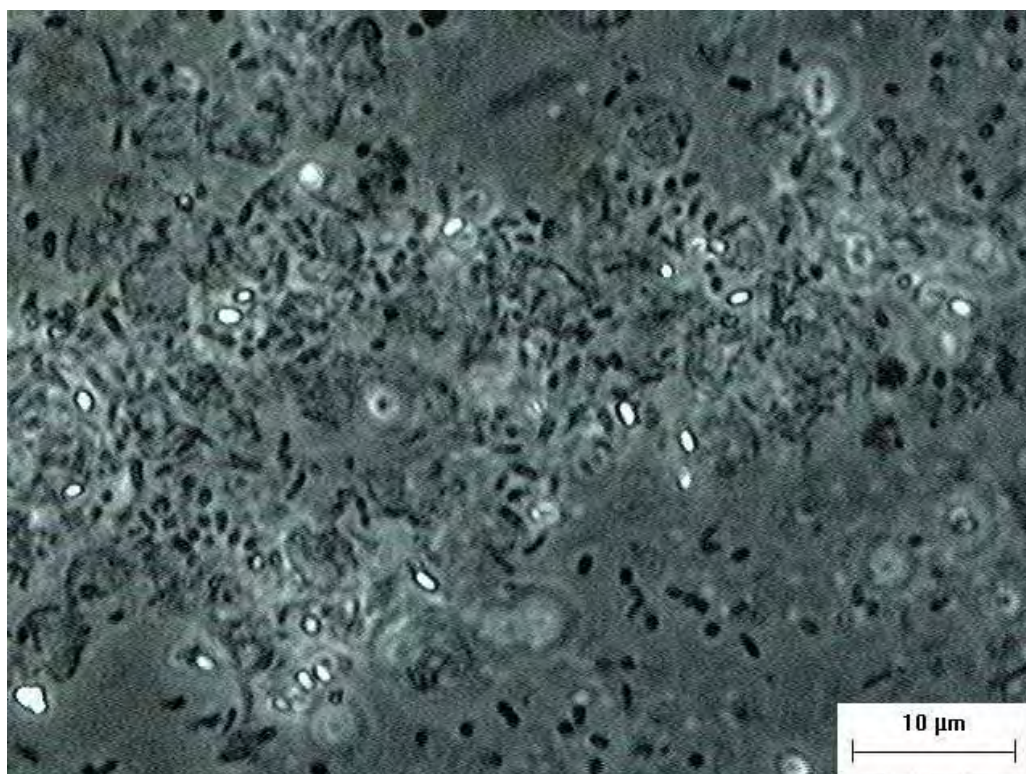


Foto 31 -Visualização de esporos e cristais em meio contendo 90% de manipueira e 10 % de sangue bovino tinalizado (meio 90M10S (T)).

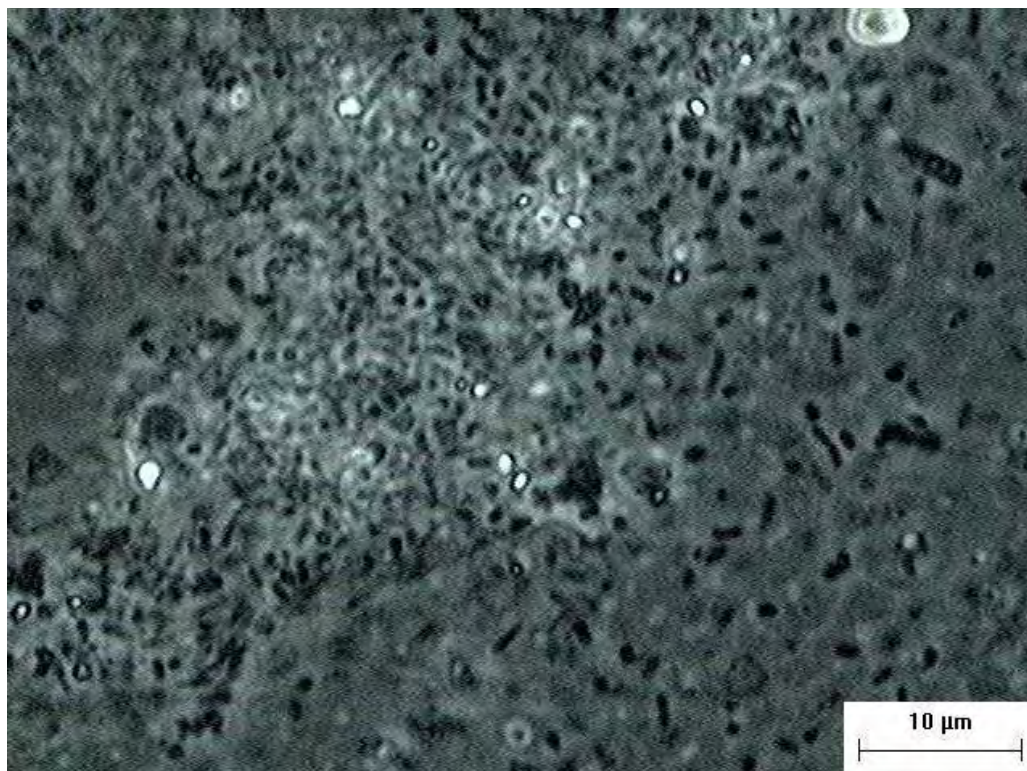


Foto 32 -Visualização de esporos e cristais em meio contendo 90% de manipueira e 10 % de sangue bovino (meio 90M10S).

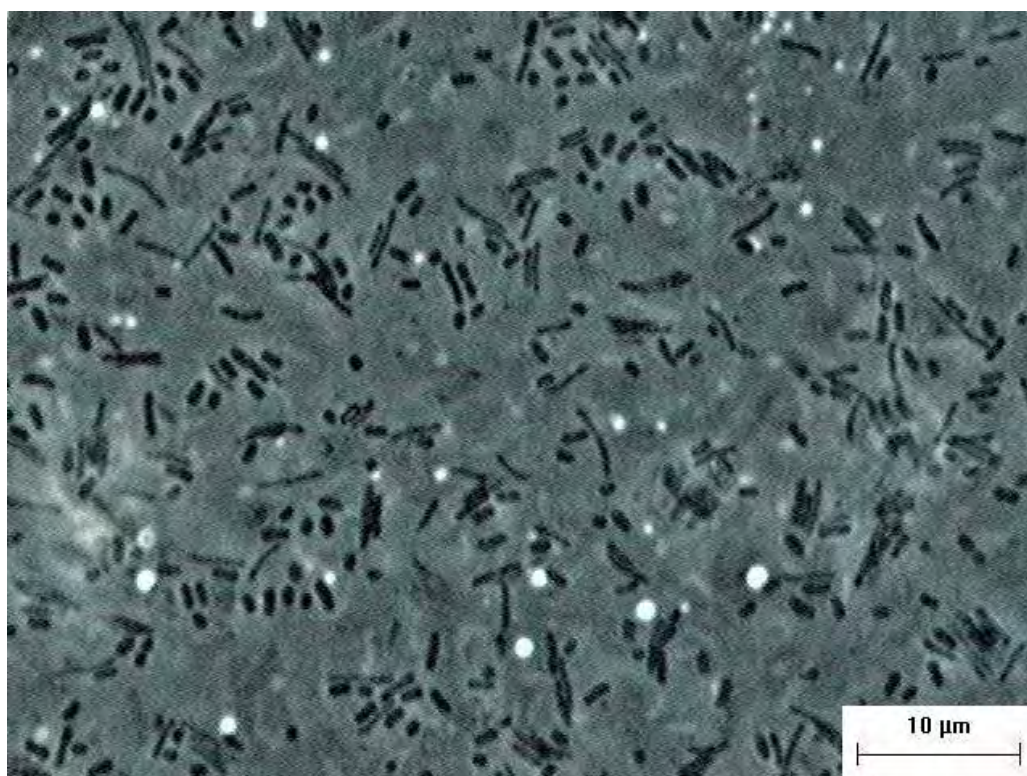


Foto 33 -Visualização de células em meio contendo 70% de manipueira e 20 % de sangue bovino (meio 70M20S).

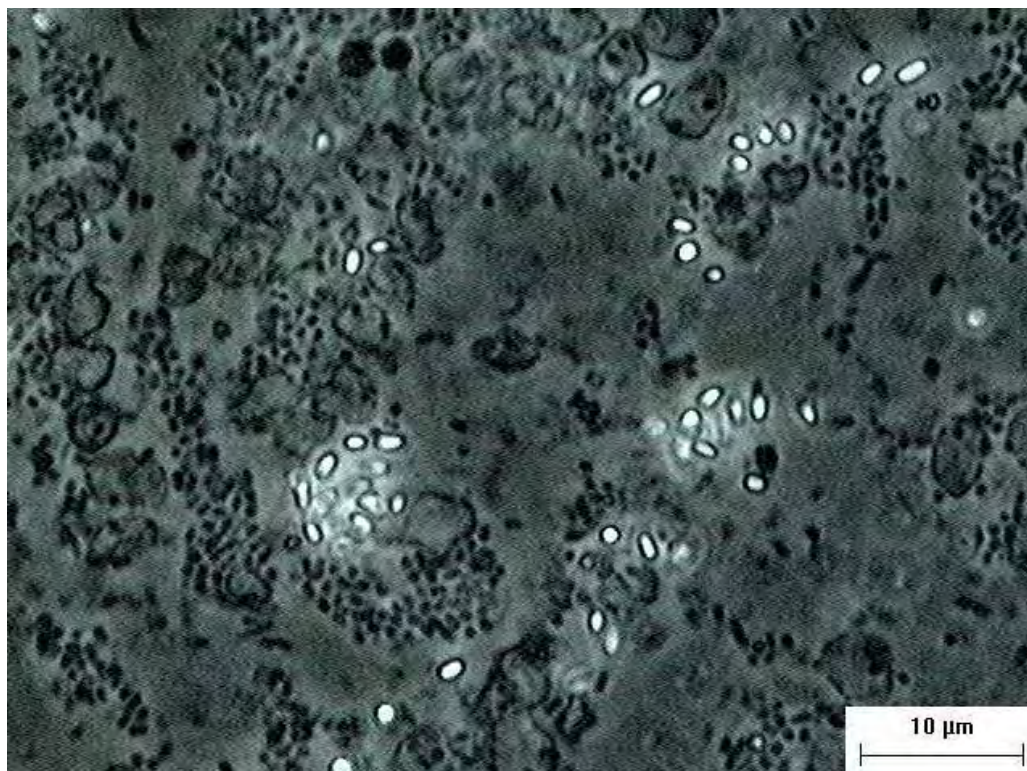


Foto 34 -Visualização de esporos e cristais em meio contendo 70% de manipueira e 20 % de sangue bovino tinalizado (meio 70M20S (T)).

9.4 CONCLUSÃO

O sangue parece agregar uma maior eficácia ao meio com manipueira, visto que se compararmos as CL_{50} dos meios contendo apenas manipueira a 90 % e 70%*, os resultados relativos à manipueira e sangue, independente do processo de tinalização, são superiores.

A tinalização ocasiona uma pequena coagulação no sangue. Este fato, aliado àquele em que, para efetuar a leitura no espectrofotômetro, faz-se “lavagens” seqüenciais com água, levaria a pensar na possibilidade da não homogeneização completa das partículas de coágulo, que não estariam sendo sedimentadas na centrifugação e então, descartadas ao se fazer a lavagem. Este descarte estaria influenciando a leitura de crescimento, no espectrofotômetro, quando se tem valores inferiores aos meios sem o processo de tinalização.

* Observar Tabela 5, página 90.

10 QUADRO GERAL DE RESULTADOS OBTIDOS

- Devido à eminência de constantes epidemias de dengue e considerando a forma de transmissão da doença, é premente a utilização de inseticidas. Entretanto, foi demonstrada a toxicidade dos inseticidas químicas, empregados atualmente.

- Todos os resíduos estudados proporcionaram o surgimento de esporos e cristais e demonstraram eficiência no combate ao mosquito *Aedes aegypti*.

- A utilização de “manipueira” nas concentrações de 500 e 600 mL/L apresentou melhor CL_{50} .

- O uso de sangue de abatedouros pode contribuir para um aumento da CL_{50} em manipueira.

- A esterilização do meio de cultura é necessária.

- A relação produção de esporos/ CL_{50} não é útil para testar eficiência do bioinseticida.

11 SUGESTÃO PARA ESTUDO FUTURO

Como sugestão para estudos futuros, recomenda-se a ampliação da variedade de resíduos para o processo fermentativo, além de estudos de misturas entre resíduos, a fim de maximizar a potência do bioinseticida.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMEED, A., CARLBERG, G., EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt - III. Selection of media for δ -endotoxina production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 313-317, 1990.
- ABDEL-HAMEED, A., CARLBERG, G., EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt - IV. Characterization of fermentation conditions for δ -endotoxina production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 231-236, 1991.
- ADAMS, T.T., EITEMAN, M.A., ADANG, M.J. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media. **Bioresource Technology** 67: 83-87, 1999.
- AMALRAJ, D.D., SAHU, S.S., JAMBULINGAM, P., DOSS, P.S.B., KALYANASUNDARAM, M., DAS, P.K. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. **Acta Tropica** 75: 243-246, 2000.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.1, p. 21-37.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 765-777.
- ANDRADE, C. F. S. ; MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. **Revista Saúde Pública** , v. 25, n. 3, p. 184-187, 1991.
- ARRUDA, R. O . M. **Estudo da fermentação semi-sólida para produção de *Bacillus thuringiensis*** . 87 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. Washington, 1995.
- ASCARI, E. Tipo de inseticida: SUCEN usa armadilhas contra *Aedes aegypti*. **Diário da Região**, São José do Rio Preto, 07 dez. 2003.
- BARZIZZA, C. M.; MANSO SOTO, A. E. **Microbiologia**. Buenos Aires: Libreria Hachette S.A. – Palacio Del Libro, 1956.
- BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and black flies. In: Entwistle, P.E., Cory, J.S., Bailey, M.J. and Higos, S. (eds) **Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. John Wiley & Sons, Chichester, 1993. pp. 147-170

BHANDARI, S. **Penicillin**: the miracle drug. Illinois: Illinois Periodicals Online (IPO), 1996. Disponível em: <<http://www.lib.niu.edu/ipo/ihy960452.html>>. Acesso em: 27 fev. 2004.

CAVALIERE, M. J., CALORE, E. E., PEREZ, N. M., PUGA, F. R. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 267-272, 1996.

CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: _____. (Coord.). **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Paulicéia, 1994. p. 11-50.

COSTA, H.; VENTURA, J. A.; BATISTA, M. G. Controle biológico: uma alternativa para o controle de mosquitos em áreas urbanas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 16., 1991, Goiânia. **Anais**. [S. l.: s. n.].

DEL BIANCHI, V. L. **Balanco de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte de Estado de São Paulo**. 1998. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DESAY, S. Y.; SHETHNA, Y. I. Growth & toxicity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. **Indian Journal Medical Research**, v. 89, p. 314 –321, 1989.

DULMAGE, H.T. Production of the spore- δ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. **Journal of Invertebrate Pathology** 16: 385-389, 1970a.

DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology** 15: 232-239, 1970b.

EJIOFOR, A. O.; OKAFOR, N. Formulation of a flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 spores and crystals as mosquito larvicide. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 202-206, 1991.

EPA PROBIT analysis program. Versão 1.5. Cincinnati, Ohio: Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency. Arquivo probit.zip. Disponível em: <www.epa.gov>. Acesso em 5 mar. 2004.

ERNANDES, S. **Estudos da utilização de sangue de abatedouros como substrato fermentativo para produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação submersa**. 1998. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

ERNANDES, S., DEL BIANCHI, V.L., MORAES, I.O., RICCO MEDEIROS, L., MONTEBELO, R.H., YAMAOKA, K. Efeito da glicose sobre o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meios de cultura compostos por triptose In: ENCONTRO DE BIOLÓGOS DO CRBio-1, 13., 2002, São Pedro. **Livro de Resumos**. São Paulo: Winner Graph Editora Ltda., 2002. p. 1-173.

ERNANDES, S., MORAES, I. O. Estudos preliminares do efeito da fonte de nitrogênio no crescimento de *Bacillus thuringiensis*. In: 24º COLÓQUIO DE INCENTIVO À PESQUISA, São José do Rio Preto. **Caderno de Resumos**. 1997a. Sessão B - Biológicas, pág. 36.

ERNANDES, S., MORAES, I. O. Verificação do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis*, obtido por fermentação submersa em meio de cultura composto por resíduo agroindustrial. In: II SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, Campinas. **Anais**. 1997b. Pag 104.

ERNANDES, S., MORAES, I. O. Estudo comparativo do padrão de crescimento de *Bacillus thuringiensis* em fermentação submersa contendo sangue de ave e sangue de suíno. In: VI SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Rio de Janeiro. **Anais: Sessões de Pôsteres**/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1998. Pág 90.

FALOCI, M. M. et al. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 32-38, 1990.

FOGEL, R.; ROGERS, P. **Penicillin**: the first miracle drug. Mar. 2002. Disponível em: <<http://herbarium.usu.edu/fungi/funfacts/penicillin.htm>>. Acesso em: 27 fev. 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed. Brasília, DF, 2001. 84 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília (DF), 2002. 32 p.

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

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.C. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 383-446.

HULL, S. R. et al. Composition of corn steep water during steeping. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 44, p. 1857-1863, 1996.

HYUN, C.-K.; SHIN H.-K. Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 34-37, 1998.

INGREDIENTE protéico Milhocina®. São Paulo: CORN PRODUCTS BRASIL. Ingredientes Industriais Ltda. Ficha técnica. Disponível em: <<http://www.cornproducts.com.br/>>. Acesso em: 22 mar. 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1990. 7ª ed., 388 p.

- 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.
- LACEY, L.A.; LACEY, J. M. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against mosquitoes of the central amazon basin. **Mosquito News**, v. 41, n. 2, p. 266-270, 1981.
- LACHHAB, K., TYAGI, R.D., VALÉRO, J.R. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. **Process Biochemistry** 37: 197-208, 2001.
- LEE, H. L.; SELEENA, P. Fermentation of a Malaysian *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 isolate, a mosquito microbial control agent utilizing local wastes. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v. 22, n. 1, p. 108-112, 1991.
- MACORIS, M. L. G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.
- MELO-SANTOS, M.A.V., SANCHES, E.G., DE JESUS, F.J., REGIS, L. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96:000-000, 2001.
- MONTERO LAGO, G.; LIERENA, R. E.; PÉREZ, M. D. Susceptibilidad comparativa de las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* al *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14). **Revista Cubana de Higiene Epidemiologia**, v. 23, p. 253-259, 1985.
- MONTERO LAGO, G; LIERENA, R. E.; AVILA, I. G.; PÉREZ, M. D. Efectividad del *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* H-14 en diferentes criaderos de mosquitos en las provincias ciudad de La Habana y Santiago de Cuba. **Revista Cubana de Higiene e Epidemiologia**, v. 38, n. 2, p. 229-236, 1986.
- MORAES, I. O. **Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa**. 1973. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1973.
- MORAES, I. O. **Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini-fermentador**. 1976. 77 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1976.
- MORAES, I. O. et al. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 815-843.
- MORAES, I. O; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. Cap. 12, p.383-432.

MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F., ARRUDA, R. O.M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b. Cap. 26, p. 815-839.

MURREL, W.G. The biochemistry of the bacterial endospore. In: *Advances in Microbial Physiology* p. 133. Acad. Press, 1967.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi Method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NORMANHA, E. S. Derivados da mandioca: terminologia e conceitos. Fundação Cargill, Campinas, 1982. 56 p.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas**: relatório sobre as diretrizes para a dengue. Washington, DC, 16 - 20 de dezembro de 1991.

PARDI, M. C. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**: tecnologia da carne e de subprodutos. Processamento tecnológico. Goiânia: Ed. UFG, 1994. v. 2, pt. 8, p. 1052-1072.

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

REGIS, L., SILVA-FILHA, M. L., LEROUX, C. N., CHARLES, J. F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 377-388, 2001.

REGIS, L., SILVA, S. B., MELO-SANTOS, M. A. V. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 207-210, 2000.

RUAS-NETO, A. L.; OLIVEIRA, C. M. Controle biológico de culicídeos e simulídeos: inseticidas bacterianos. **Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, p. 61-75, 1985.

RUAS-NETO, A. L.; SILVEIRA, S. M.; COLARES, E. R. C. Mosquito control based on larvicides in the State of Rio Grande do Sul, Brazil: choice of the control agent. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 222-230, 1994.

SALAMA, H., FODA, M. S., DULMAGE, H. T., EL-SHARABY, A. Novel fermentation media for production of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 41, p. 8-19, 1983.

SALAMA, H. S., MORRIS, O. N. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: ENTWISTLE, P. F. et al. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Pesticide: Theory and Practice. England: John Wiley & Sons, 1993. Chap. 11, 237-253.

SANTOS, L. U.; SOUZA, A. B.; ANDRADE, C. F. S.; SOUZA, C. E. P. Uso de *Bacillus thuringiensis* (H-14) como agente de controle de mosquitos em um cemitério. **Revista Patologia Tropical**, v. 23, n. 2, p. 151-158, 1994.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE; CONSELHO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE. **Plano diretor de erradicação do *Aedes egypti* no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1997.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOUZA, K. B.; MORAES, I.O.; ERNANDES, S. Estudos dos efeitos da esterilização em meio de cultura composto de sangue de suíno na produção de *Bacillus thuringiensis*. **Livro de Resumos**. I ENEALI - Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia de Alimentos. Viçosa/MG 1998.

SUAREZ, M. F.; AYALA, D.; NELSON, M. J. Evaluacion de dos formulaciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 para el control de larvas de *Aedes aegypti*. **Biomedica**, v. 7, n. 1-2, p. 5-12, 1987.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. Documentos técnicos. Mai. 2004. Disponível em: < <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm> >. Acesso em: 20 mai. 2004.

TEIXEIRA, C. F., AUGUSTO, L. G. S., MORATA, T. C. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 417-423.

THIERY I., BACK, C., BARBAZAN, P., SINÉGRE, G. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. **Annales de L' Institut Pasteur**, v. 7, n. 4, p. 247-260, 1996.

VENTURA, J. A.; BATISTA, M. G.; COSTA, H. Avaliação do controle biológico de mosquitos na lagoa do Palmar em Vila Velha, ES. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., 1990, Brasília. **Anais** [S. l.: s. n.], 1991. p. 95.

VILARINHOS, P. T. R., DIAS, J. M. C. S., ANDRADE, C. F. S., ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 447-480.