



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DÉBORA PESSOA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA
PRODUÇÃO DE ENDOTOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.**

RECIFE

2018

DÉBORA PESSOA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA
PRODUÇÃO DE ENDOTOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o Dr^o Raquel Pedrosa.

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D451d OLIVEIRA, DÉBORA PESSOA
DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA PRODUÇÃO DE
ENDOTOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis*. / DÉBORA PESSOA OLIVEIRA. - 2018.
66 f. : il.

Orientador: RAQUEL .
Coorientador: ANA PORTO.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

1. Biolarvicida. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Micro-organismos fotossintetizantes. 4. Extrato de palma. I. ,
RAQUEL, orient. II. PORTO, ANA, coorient. III. Título

CDD 574

DÉBORA PESSOA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA
PRODUÇÃO DE ENDOTOXINAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.**

Monografia, apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.

Recife, _____, de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Raquel Pedrosa Bezerra – UFRPE
(Orientador)

Profª Drª Daniela de Araújo Viana Marques – UPE
(Titular)

Profª Drª Polyanna Nunes Herculano – Faculdade São Miguel
(Titular)

Drª José Manoel Wanderley Duarte Neto – IPA
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita misericórdia e graça ofertadas a mim todos os dias. Por me amar de forma leal e especial. Ao filho salvador e ao Espírito Santo consolador.

À minha mãe pela sua paciência, amor e dedicação. Por ser uma amiga dedicada e por ser alguém em quem eu posso confiar. Obrigada por acreditar em mim.

A minha irmã Keila pelas tantas conversas e sorrisos juntas. Pela dedicação e confiança em mim e por me amar de forma tão especial.

A todos que fazem parte da UFRPE e ao programa de iniciação científica. Desde a reitoria até o grupo dos docentes, em especial os professores do curso de licenciatura em Biologia por suas contribuições tão dedicadas e inspiradoras em minha formação. Aos funcionários dos setores administrativos que atendem de forma tão especial os estudantes, em especial Sirlei, Sr. Augusto, Thaisa e Mônica.

As professoras Betância Guilherme e Flávia Lins pelas suas contribuições e apoio em minha formação. Como também a extensão universitária que promoveu uma formação além da universidade.

Aos funcionários do Restaurante Universitário que nos atendem todos os dias com alimentos em especial a funcionária Maria que é uma inspiração pela sua força de vontade e luta.

A igreja do Evangelho Quadrangular e aos meus pastores Sérgio Santos e Mariana Angélica. A todos que fazem parte dos ministérios comigo e tem compartilhado das nosso crescimento em Deus. E a todos os pastores auxiliares. Aos membros e amigos da célula.

A turma BioHarly e todos seus componentes por caminhar comigo nesta jornada e por me acolherem como amigos, tornando está graduação mais leve e amorosa. Como também a todas as turmas nas quais tive o prazer de cursar disciplinas e conhecer pessoas especiais.

Aos amigos e colegas da UPE nos quais passei meu primeiro período.

A todos doutores, mestres e estudantes do Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) e Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) pelo seu apoio e contribuição. Em especial a Livia, Carol e Miller.

Aos meus amigos e colegas que tem contribuído para a minha vida com tanto amor e carinho. Em especial Bruna, Thaysa, Ane, Marina, Mayara, Suh e Karen.

À minha orientadora Raquel Pedrosa por ser paciente e dedicada. Por ser uma profissional tão exemplar na qual tive o prazer de poder ter nesta graduação.

DEDICATÓRIA

Porque dEle e por Ele, e para ele, são todas as coisas, glória, pois, a Ele eternamente.
Amém.

Romanos 11.36

RESUMO

O milho é um dos principais grãos da produção nacional, mas a sua produtividade não corresponde a potencialidade. Pragas como *Spodoptera frugiperda* tem afetado diretamente sua cultura. Nos últimos 50 anos, a forma mais efetiva de controle é o uso de pesticidas químicos que tem apresentado diversos problemas ambientais e de saúde pública. O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram-positiva, esporulante, que possui a capacidade de produzir inclusões cristalinas com ação tóxica contra insetos. Bioinseticidas fabricados a partir de *Bacillus thuringiensis* são uma alternativa biológica aos inseticidas químicos. O biopesticida é fabricado incluindo os esporos e endotoxinas. Viabilizar o uso de agrosustratos locais para a produção desta bactéria é uma alternativa para diminuir custos e fornece um produto acessível. O objetivo desse trabalho foi produzir endotoxina por *B. thuringiensis* utilizando meios alternativos constituído por extrato de palma e líquido metabólico microalgas fotossintetizantes. O *B. thuringiensis* foi cultivado em meios constituídos por extrato de palma e líquido metabólico do cultivo de *Arthrospira platensis* (meio A), ou *Scenedesmus* sp. (meio B), ou *Chlorella vulgaris* (meio C), ou *Dunaliella tertiolecta* (meio D). Os mesmos com ou sem a adição de ureia foram colocados em frascos de Erlenmeyer de 50mL contendo 20 mL de meio por 96 horas, 200 rpm e 30°. Foram analisados a densidade óptica (DO), biomassa, número de esporos, quantidade de endotoxinas produzidas e visualização dos cristais de endotoxinas por microscópio eletrônico de varredura. Os meios de cultura constituídos por líquido metabólico de *C. vulgaris* com e sem ureia, constituído pelo líquido metabólico de *Scenedesmus* sp. com uréia obtiveram os maiores valores de DO, biomassa, produção de esporos e de endotoxinas, com resultados próximos aos obtidos pelo meio de cultura padrão LB. Esses dados demonstram o potencial dos micro-organismo constituídos por extrato de palma e sobrenadantes de líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes para produção de endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis*.

Palavras-Chaves: biolarvicida, Bt, micro-organismos fotossintetizantes, extrato de palma, uréia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produção e qualidade de milho no Brasil das safras de 2010–2011 ^a 2015–2016	5
Tabela 2 - Composição dos meios de cultura para crescimento de <i>B. thuringiensis</i> ..	37
Tabela 3 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas no cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de <i>C. vulgaris</i> , extrato de palma com e sem uréia	44
Tabela 4 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas no cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de <i>Scenedesmus sp.</i> , extrato de palma com e sem uréia.....	45
Tabela 5 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas no cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de <i>A. platensis</i> , extrato de palma com e sem uréia.....	46
Tabela 6 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas no cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de <i>D. tertiolecta</i> , extrato de palma com e sem uréia.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais países produtores de milho na safra 2015/16.....	3
Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Postura de ovos (A); larvas de primeiro ínstar (B); lagarta em dieta (C); pupa no solo (D).	7
Figura 3 - Morfologia da célula vegetativa de <i>B. thuringiensis</i>	15
Figura 4 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura padrão LB, após 96 h de crescimento, da esquerda a duplicata e a direita matriz.	43
Figura 5 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> e ureia, após 96 h de crescimento, da esquerda a duplicata e a direita matriz.	43
Figura 6 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i> e ureia, após 96 h de crescimento, da esquerda a duplicata e a direita matriz.	43
Figura 7 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> e ureia, após 96 h de crescimento, da esquerda a duplicata e a direita matriz.	44
Figura 8 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura padrão LB, após 96 h de crescimento	47
Figura 9 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> e ureia, após 96 h de crescimento.....	48
Figura 10 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i> e ureia, após 86 h de crescimento.....	48
Figura 11 - <i>Bacillus thuringiensis</i> BT370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> e ureia, após 86 h de crescimeto.....	49

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	1
1.1	A cultura do milho e a produção mundial	1
1.1.1	A cultura de milho no Brasil	4
1.2	Características de <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
1.2.1	Tipos de controle.	5
1.2.1.1	Problemas no controle.....	10
1.3	Uso de inseticidas e necessidade novas alternativas	12
1.4	Características gerais do <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.4.1	Breve histórico.....	17
1.4.2	O entomopatogeno de <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
1.5	Produção de toxinas	19
1.5.1	Proteína Cry	19
1.5.2	Proteína Cyt	21
1.5.3	Proteínas Vip	24
1.6	Etapas da produção	25
1.7	Meios de cultura	28
1.7.1	Uso de resíduos ou subprodutos agroindustriais	28
2	INTRODUÇÃO	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Micro-organismo e manutenção	35
3.2	Preparo do pré inóculo	35
3.3	Preparo do extrato do extrato de palma	35
3.4	Obtenção do líquido metabólico dos micro-organismo fotossintetizantes (LMMF)	35
3.5	Obtenção do líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes (LMMF)	36
3.6	Produção de endotóxicas por fermentação submersa	36
3.7	Métodos analíticos	37
3.7.1	Densidade Ótica (D.O)	37

3.7.2	Biomassa do cultivo de <i>B. Thuringiensis</i>	37
3.7.3	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC)	37
3.7.4	Quantificação de proteínas	38
3.7.5	Microscópio eletrônico de varredura (MEV)	38
4	RESUTADOS EDISCUSSÃO	39
4.1	Quantificação de esporos e endotoxinas	Erro! Indicador não definido.
5	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A cultura do milho e a produção mundial

A questão da oferta agrícola é algo que marca profundamente as populações mundiais ao longo dos anos. No entanto o uso em diversas indústrias de processamentos de forma prioritária, torna este produto uma cultura de estratégia na produção nacional. Sendo um dos principais grãos nacionais pelo uso versátil em várias ramificações industriais, pelo subsídio a alimentação humana e animal, como também pelo caráter social de sustento de uma gama de pequenos produtores (IBGE, 2006, p. 146).

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea, pertencente à família Poaceae, ordem Poales. Tem como provável região de origem a região central ou México, já que os primeiros registros foram em ilhas próximas a essas regiões. Foi uma das primeiras culturas a ter seu cultivo dominado pelo homem, sendo os primeiros cultivos registrados em civilizações pré-colombianas. Após a retomada de Colombo das Américas, começou a ser introduzida na Europa. Desde a antiguidade ocorre a seleção natural e artificial que geraram uma diversidade de mais de 300 tipos, em diferentes condições ecológicas. Essa diversidade torna o grão com grande variedade de genótipos (BURANELLO, 2009; PATERNIANI, 1993).

No atual cenário econômico os commodities são essenciais para a estabilização da balança do mercado, sendo afetados diretamente por ela (CEPEA, 2013). Atualmente, o milho é um dos principais commodities produzidos, com seu valor acrescido basicamente em grãos "*in natura*", sendo utilizado para diversas áreas. Tendo uma grande valia como cultura mundial devido aos seus valores nutricionais. Ele é caracterizado como uma fonte energética pela grande quantidade de carboidratos, onde cerca de 72% da sua composição aproximadamente é de amido, contendo ainda lipídeos, fibras alimentares, vitaminas importantes e proteínas também podem ser encontradas. Sendo assim, mais da metade da sua safra é destinada ao consumo animal (DIAS e PAES, 2006; FANCELLI e DOURADO NETO, 2000; Souza e Braga, 2004).

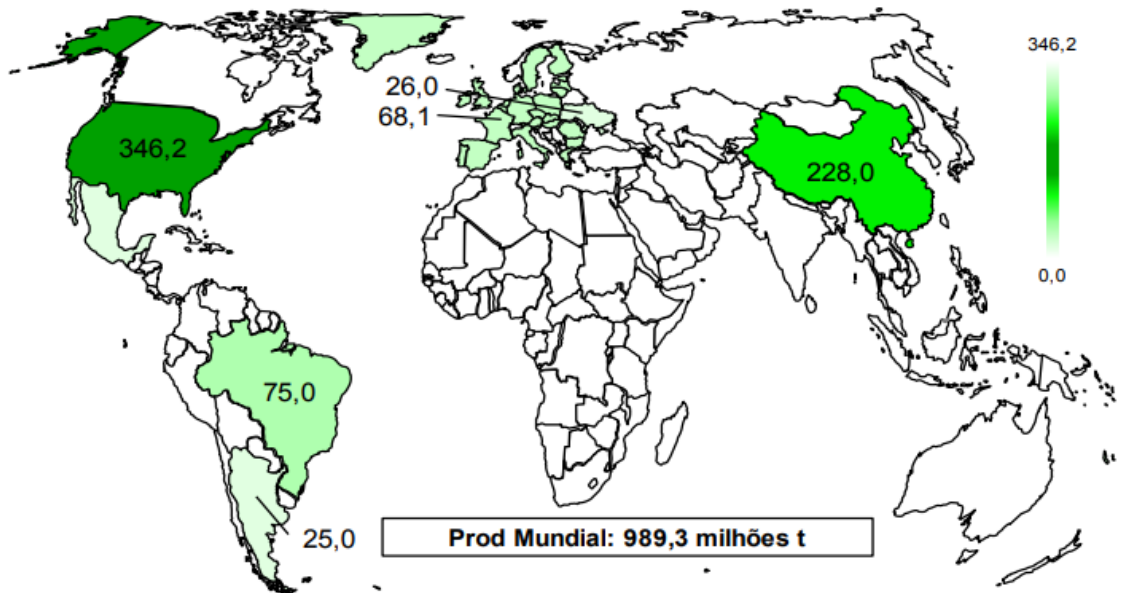
Pelo alto grau de nutrição é conferido uma grande diversidade para suas aplicações culinárias. Puro ou acrescido de ingredientes, é uma importante fonte energética que compõe várias receitas. Contrariamente aos outros ingredientes

presentes no dia-a-dia, o milho fica com sua casca que é rica em fibras e auxilia na eliminação de toxinas do corpo humano. Na indústria é utilizado na produção de vários subprodutos, como: óleos, margarinas, maioneses e outros componentes. O amido ainda pode passar por processos e ser transformado em dextrina componente de adesivos e xaropes, por exemplo, ou ainda em dextrose que é utilizado em enlatados, como também em frutose, um dos principais adoçantes na produção de bebidas e doces. Atualmente também é utilizado como polímero biodegradável. No EUA, por exemplo, a grande maioria de produtos das mais variadas origens de produção tem componentes pertencentes ao milho. Contudo seu uso prioritário é para alimentação de suínos e aves (OKUMURA et al., 2011; ABIMILHO, 2017; PEIXOTO, 2002)

A respeito da sua origem não há apenas uma teoria. Weatherwax (1954), defende o que chamamos de teoria divergente, onde o milho, teosinto e o tripsacum originaram-se de um de um ancestral único. Numa segunda possibilidade o milho e o teosinto teriam um ancestral comum de onde divergiram. Na terceira hipótese e mais amplamente aceita o milho se diversificou a partir do teosinto. Essa última teoria tem se baseado em comprovações genéticas e citológicas, ambos são formados por 20 pares homólogos de genes e geram a primeira filiação fértil. No entanto, há uma grande diferença das variações de milhos para este possível ancestral, já que a pressão de mudanças através das seleções é constante (Bennetzen et al; Serratos, 2012)

O grau de seleção é tão grande que as espécies só sobrevivem com o investimento de cuidados e tecnologias interferindo diretamente. Para atingir um bom desenvolvimento dos grãos é necessário um clima adequado e uma oferta regular de água. É o cereal mais cultivado do mundo constituindo-se como uma das bases alimentar em muitas regiões (NASS; PATERNIANI, 2005; ROSAS- CASTOR et al., 2014). Ocupa a posição de segundo maior volume mundial em grãos. Três países prioritariamente concentram a maior parte da produção. Sendo eles: EUA, China e Brasil. Na produção o Brasil ocupa o terceiro lugar. Já no restante dos produtores há uma divisão bem equilibrada, onde os 10 maiores produtores após os principais concentram um pouco mais que 10% da produção total (USDA, junho/15)

Figura 1 - Principais países produtores de milho na safra 2015/16



O mercado internacional do milho possui diversos países importadores. Sendo os principais exportadores: EUA, Brasil que ocupa a segunda posição seguido pela Argentina. Esses países somam mais de 70% das exportações (PEIXOTO, 2014). De forma estrutural os Estados Unidos têm uma política mais consolidada em seus estados para sustentar a produção do milho. Essa produção é destinada a geração de ração para animais e produção de etanol, além do consumo humano. Já no Brasil, há uma fragmentação da política nacional para sustentar a produção nacional. Essa ação seria muito importante para a articulação ao mercado internacional (GLAT, 2010).

A redução da produção americana no ano de 2012 e os aumentos dos preços geraram preocupação no mercado que tem suas limitações regionais. As necessidades que precisam ser atendidas nos próximos anos através de investimento em tecnologias que estabilizem essas produções. Apesar dos países principais terem grandes produções, o valor da exportação ainda é baixo diante das demandas do mercado o que causa uma divisão em equidade pelos principais importadores que em 2016 foram: Japão, México, União Europeia e Coreia do Sul. Até 2020, haverá um aumento na diversidade de áreas cultivadas pela expansão territorial. Os países participantes desta expansão serão China, Brasil e o continente Africano. No entanto, a China tem limitações ambientais e o continente africano tem limitações institucionais. Apesar das mesmas limitações institucionais o Brasil tem áreas

consideráveis que podem ainda ser incorporadas e a possibilidade de um aumento significativo da segunda safra (USDA, 2012; ALVES e AMARAL, 2011).

1.1.1 A cultura de milho no Brasil

No Brasil, antes da chegada dos colonizadores, já havia o consumo de milho pelos índios, como um dos principais ingredientes da sua dieta. Após a chegada dos portugueses esse é um hábito que vai sendo incorporado a alimentação da população (APROSOJA, 2016). Além de ocupar a terceira posição em relação a produção, o país é quarto maior consumidor e o segundo maior exportador. Colaborando para a dimensão e importância deste grão no país. Diante da demanda de um mercado que vem crescendo nos últimos anos. Os três maiores exportadores: EUA, Brasil e Argentina, criaram a The International Maize Alliance (Maizall) que visa o aumento da produção desses países, como também a produtividades dos mesmos. Desta forma, essas alianças tem o objetivo de avaliar barreiras regulatórias deste cereal, promovendo um fornecimento cabível as necessidades das exportações (ESTADOS UNIDOS, 2016).

Dos países que compõem essas alianças, o Brasil se destaca pela produção em duas safras anuais. A produção é relativamente dispersada em regiões. O destino da produção do país visa atender a demanda nacional e garantir excedente para a exportação com plantios em todo país. Na primeira safra, chamada plantio de verão, tem a sua realização em períodos chuvosos que varia entre o final de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste (no Nordeste este período ocorre no início do ano). Já no plantio de segunda safra ou safrinha, no período de inverno, ocorrem depois da soja precoce nas região centro-oeste e nos estados do Paraná e São Paulo. Esse cultivo começou como um cultivo sem pretensões, mas atualmente tem se tornado maior que o cultivo da primeira safra, já que na primeira safra há uma preferência pela soja (MAPA, 2013).

Nos últimos anos é possível observar uma queda considerável da primeira safra que se estabelece pela rentabilidade da soja e um risco menor para a produtor. Já na segunda safra ao longo dos anos a produção cresceu, já que é necessário uma cultura rotacional com a soja e estabelecer um fornecimento para a entressafra favorecendo o mercado internacional já que ocorre no período da safra do hemisfério norte e das demandas internacionais que surgiram desde 2013 pela seca dos EUA,

conjuntamente com a necessidade mundial comandada pela China. Apesar de uma produção diferenciada a segunda safra ainda tem menor produtividade, implicando diretamente na produção e economia nacional (CONAB, 2016)

Tabela 1- Produção e produtividade de milho no Brasil das safras de 2010–2011^a 2015–2016

Safra	2010–2011	2011–2012	2012–2013	2013–2014	2014–2015	2015-2016
Produção 1 ^a safra (1.000 t)	34.079,20	34.946,70	33.867,10	34.576,70	31.652,60	30.082,00
Produção 2 ^a safra (1.000 t)	22.460,30	39.112,70	46.928,90	48.399,10	54.590,50	40.840,70
Produtividade 1 ^a safra (kg/ha)	4.576	4.481	5.097	4.783	4.898	4.799
Produtividade 2 ^a safra (kg/ha)	3.641	5.133	5.188	5.254	5.716	3.877

Fonte: Elaborada com dados da Conab (2016).

Apesar de demonstrar uma das melhores taxas de crescimento na área agrícola. Sendo a segunda maior área cultivada e a segunda maior produção, tendo a sua taxa de crescimento em exportação sendo validada ao longo dos anos. O Brasil tem esbarrado em problemas antigos, com potencial para a produção de que equivalente 16 toneladas por hectares, temos produzido, em média, (5.110 kg ha^{-1}) apenas. Na região Nordeste, a produtividade média é ainda menor (2.262 kg ha^{-1}), sendo que no estado do Rio Grande do Norte essa produtividade é de apenas 448 kg ha^{-1} colocando os números nacionais inferiores que o potencial (MONTEIRO et al., 2000; CONAB, 2017). De acordo com Buranello (2009) França, Itália e os Estados Unidos conseguem alcançar produtividade que chega a 8 kg por hectare. Mesmo com esses indicadores baixos, é necessário investimento no potencial para a produtividade. Essa baixa produtividade está diretamente atrelada ao não uso de tecnologia, onde apenas 11% dos produtores tem acesso a essas tecnologias.

1.2 Características de *Spodoptera frugiperda*

Há um impacto gerado pela remoção da vegetação para o cultivo. Sendo assim reajustado e afetado o processo de sucessão natural das espécies. Com a grande área plantada no Brasil, cultivos sucessivos, aplicabilidade reduzida dos manejos necessários tornam viáveis o surgimento de pragas. Os insetos considerados pragas, são aqueles capazes de causar danos nas plantas que geraram um déficit econômico, gerando uma diminuição da produtividade ou na qualidade final do produto. Com o

passar dos anos essas espécies de plantas evoluem, assim também as espécies de insetos acompanham essa evolução em um processo de coevolução (METCALF E LUCKMAN, 1994).

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) da ordem *Lepidoptera*, é umas das principais pragas da cultura do milho no Brasil que ocasiona a destruição do cartucho, por isso também é chamada de lagarta-do-cartucho. Seus danos são ocasionados pela a sua ação direta na lavoura afetando o rendimento, como também a dificuldade do seu controle através de métodos tradicionais e a recorrência nas safras. Em todos os estágios do desenvolvimento da planta é afetado pela lagarta, causando prejuízos diretos ao grão. A praga ainda pode facilitar o ataque de outros microrganismos (MORAES *et al.*, 2015).

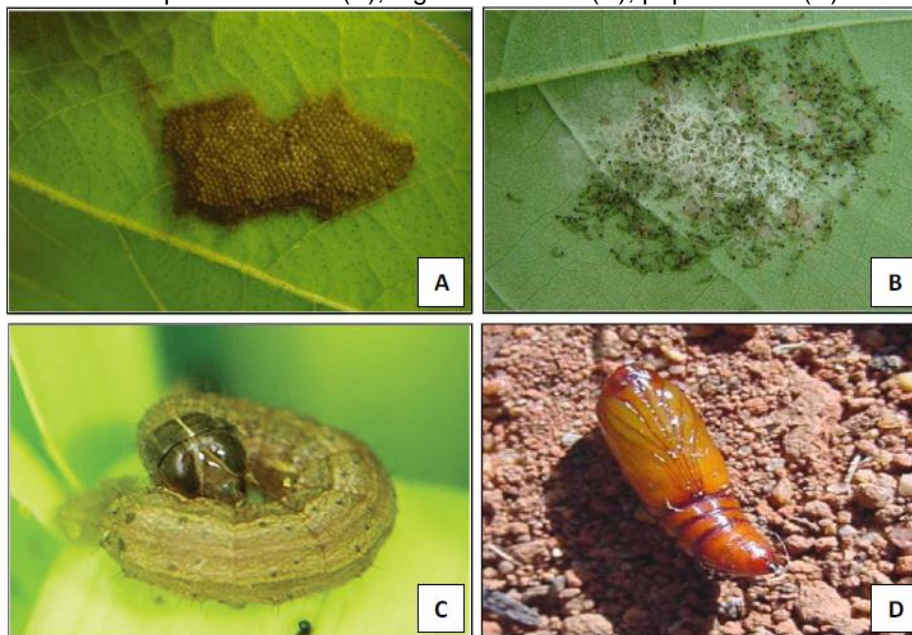
É considerada uma espécie endêmica do hemisfério ocidental com grande capacidade de dispersão, holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adultos. Seus centros de imigração estão localizados nos trópicos, mas a sua primeira ocorrência foi relada em 1797 na América do Norte, na Geórgia. É um inseto de metamorfose completa, as fêmeas podem colocar de 1000 a 2000 ovos. A eclosão das lagartas ocorre em três dias, ficando localizadas no interior das folhas jovens de onde se alimenta dessa região conhecida como “cartucho” e perfuram toda a planta. A duração do período larval tem seu estágio em torno de 15 a 20 dias, quando completamente desenvolvida a lagarta mede 40mm de comprimento. No final desse período a lagarta penetra no solo passando ao estágio de pupas. O indivíduo adulto pode ser encontrado próximo ao solo ou nas folhas. O macho apresenta asas mais escuras, mas a fêmea carrega asas cor de palha ou pardas, chegando a quase 3 cm (VALICENTE & CRUZ, 1991; GALLO *et al.*, 2002; CRUZ, 2008)

Dependendo de qual fase de vida a lagarta há um acúmulo de dejetos no centro da planta pelo processo de dano causado nas folhas. O parênquima foliar de uma das faces da folha do milho é acometido pelas lagartas recém eclodidas, perdendo a coloração, em estágios mais avançados há a perfuração e destruição do cartucho. O ataque também pode se dirigir para a região da espiga, onde essa ação contra o pedúnculo pode causar danos a formação de grãos. Ainda na espiga pode se alimentar diretamente dos grãos pela parte basal. Os danos mais severos são causados por lagartas de maiores instares pelo seu tamanho e proporção da alimentação. Além disso, a abertura de poros ao longo da planta amplia a gama de

outros hospedeiros como bactérias e fungos que podem facilitar a morte da planta. (CARVALHO, 1982; BIANCO, 1991; VALICENTE & CRUZ, 1991).

O ataque ocorre em todos os estágios de desenvolvimento do milho. As perdas podem reduzir em 34% a 52% o rendimento das plantas. Em função dos sucessivos ataques as perdas passam dos 500 milhões de reais perdidos anualmente. O controle desta praga é um desafio ao produtor, já que há uma grande diversidade hospedeiros disponíveis ao longo do cultivo, como também a deficiência na dimensão dos ataques e estágios já que uma variação na localidade do desenvolvimento e a exposição externa não dimensiona o grau de incidência (CRUZ et al., 2002; FIGUEREIDO et al., 2005; GALLO et al., 2002).

Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*. Postura de ovos (A); larvas de primeiro ínstar (B); lagarta em dieta (C); pupa no solo (D).



Fonte: www.fmcagricola.com.br/coletaneafmc.aspx

1.2.1 Tipos de controle

No Brasil, o principal controle utilizado desta praga é o controle químico através da pulverização de inseticidas. Atualmente existe mais de 100 produtos registrados em diversas classes para o controle da mesma. No entanto, há um uso excessivo deste método de controle, baseado em calendário predeterminados e na ausência de monitoramento adequado. Atualmente se gasta quase 2 bilhões de reais nesta forma de controle (FERREIRA et al, 2010).

Em uma pesquisa realizada recentemente foram testados os inseticidas inseticidas Lambda-cialotrina utilizado juntamente com Chlorantraniliprole, Metoxifenoza e Cipermetrina, onde o número de lagartas vivas frente a testemunha, foi reduzida em pelo menos uma análise. Porém nenhum dos produtos apresentou a eficiência mínima de 80% de controle, contra as lagartas do cartucho. No grupo de reguladores do crescimento é muito utilizado o lefenuron que possui uma eficiência comprovada (NERI et al, 2005). A planta do milho absorve o silício do solo. Depositado nas paredes das células, gera benefícios para a planta, aumentando a sua resistência vegetal quando há ataques de insetos e patógenos (NOJOSA et al, 2006)

Há uma grande variedade de medidas sendo empregadas para a lagarta que perpassam desde o controle químico, cultural e biológico (CRUZ, 1995). No entanto, o emprego do controle químico não tendo rendido respostas suficientes ao uso (BARROS, 2010). Para o controle biológico uma das alternativas são uso de insetos predadores, parasitóides ou patógenos. Os predadores se alimentam dos ovos e lagarta, sem causar danos a lavoura. Esses insetos são reguladores naturais que não influenciam na gama de produção. Os parasitoides utilizam a lagarta ou seus ovos como hospedeiros (CRUZ, 2008). Outro tipo de controle é seleção e aplicação de plantas resistentes que combinem características genéticas específicas, onde as mesmas vão desenvolver mecanismos genéticos através da seleção natural que as impediram de ter um maior ataque da lagarta em conjuntura com a atração de predadores da mesma (TRACY, 2001).

Um dos parasitoides utilizados no controle biológico é o *Telemonus remus* que é capaz de parasitar todas as camadas dos ovos dos hospedeiros. É originário da Malásia e Nova Guiné, mas introduzido no Brasil na década de 80. É considerado uma forma de controle promissora em alguns países atingindo níveis de controle satisfatório (POMARI, et al 2013). No entanto, há uma realidade diferente no Brasil. As fêmeas desses insetos são capazes de trabalhar durante dia e noite, o que eleva as suas chances. Contudo há um método de liberação correta e o controle que deve ser feito (IVAN, 2016)

Tesourinhas, como a *Doru luteipes* também são utilizadas para métodos de controle biológico. A sua utilização é devido ao seu elevado número de consumos de ovos por dia, tanto pelos adultos como pelos mais jovens. No entanto, é necessária uma grande quantidade do predador nas plantas afetadas para ter uma redução significativa e gerar um controle. Além disso a atração de predação só ocorre quando

há um pico populacional. No entanto essa eficiência só seria mais significativa se essa atração ocorresse antes do pico, já que há uma comum ocorrência dos mesmos nas plantações (WAQUIL et al, 2016; NONINO, 2007).

Além dos controles com parasitas e predadores também é possível realizar o controle com baculovirus. Que são vírus que produzem um certo grau de toxicidade para as lagartas. Os baculovirus isolados da lagarta recebem o nome do seu hospedeiro. Atualmente há o uso de um pó que está sendo usado para pulverizar as lavouras, feito a partir de isolados da própria lagartas tratadas em laboratório com dietas específicas. O ciclo consiste quando são inseridos, se dissolvem, ocorrendo a liberação das partículas virais penetrando nas células do intestino e se multiplicando no seu núcleo (VALICENTE, 2010). As partículas são capazes de atingir e atravessar membranas, chegando na hemolinfa e causando uma infecção sistêmica. A célula infectada forma novas partículas virais que penetram em poliedros. Essas células rompem-se e são liberadas grandes quantidades de poliedros, tornando a lagarta debilitada. No entanto a morte só ocorre em torno de sete dias após a inoculação (MOSCARDI, 1983)

Além das formas citadas, as técnicas inovadoras que surgiram do advento da tecnologia genética. São a introdução das plantas geneticamente modificadas que carregam genes de bactérias entomopatogênicas no seu DNA. Essa inserção de genes resistentes conferem ao milho capacidades de resistência dos ataque das principais pragas da cultura. Essa resistência é adquirida através das propriedades produzidas pelas proteínas do *Bacillus thuringiensis*. O gene introduzido codifica as capacidades inseticidas da bactéria em partes das plantas que quando ingeridas vão conferir a morte dos insetos causando danos as células epiteliais (Loguercio et al. 2002).

No passado, o controle de pragas baseava-se no método de aplicação em larga escala e continuada de inseticidas, devido ao baixo custo e largo espectro. Entretanto, com o tempo verificou-se que essa prática era inadequada por provocar contaminação no agroecossistema causando desta maneira, seu desequilíbrio. Sendo assim, nas décadas de 50 e 60, surgiu o conceito de controle integrado de pragas, cuja característica é empregar com maior amplitude as táticas de controle dos agentes nocivos (CARVALHO; BARCELLOS, 2012).

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) onde são utilizadas táticas isoladas ou associadas baseadas no contrapeso do custo/benefício, levando em conta os

impactos implicado em nível local, social e ambiental. Está técnica de manejo não visa a exclusão dos métodos, mas o uso racional dos métodos de controles disponíveis através de técnicas que mensurarão nas quais pragas primárias e secundárias. Desta forma, também se define qual a menor população que causará danos aquele cultivo e qual forma de prevenção e remediação que causará menos danos aos cultivos e as populações de ação positiva sobre as pragas. Fazendo equivalências entres esses danos e os melhores padrões de ação. É uma técnica de monitoramento constante e específica desde a fase vegetativa e reprodutiva da planta. Onde é decidido a associação a pulverização ou não em determinado tempo de cultivo. Desta forma usando daquilo que está disponível para controle de forma a acarretar menos danos ao ambiente e as culturas. Dessa forma os bioinseticidas tem proporcionalidades financeiras e específicas de ação para serem utilizados neste agrupamento de táticas (CRUZ, 1999; PICANÇO, 2004).

1.2.1.1 Problemas no controle

Um dos fatores de ingerência desta praga, no Brasil, é oferecimento de uma grande variedade de hospedeiros ao longo de um ano de sucessivas culturas e do seguimento entre safra e safrinha. Esses cultivos comerciais tem uma grande capacidade de hospedar e de sustentar o ciclo de vida de uma safra a outra. A extensão territorial também disponibiliza que essa diversidade não restrita da dieta seja alimentada pela grande diversidade em quantidade de cultivares ao longo das potencialidades cultivadas em cada região do país (BARROS et al, 2010)

Além de ser uma praga de controle difícil, a ineficácia do seu manejo tem sido causada pela falta de monitoramento adequado (MELO et al, 2011). Dessa forma, há um combate tardio atrelado ao mal uso de inseticidas. As aplicações são realizadas de forma inadequada, sem conhecimento ou avaliações prévias em relação a quantidade ou formas mais eficazes das ações específicas, ou seja, há um aumento no custo para o controle sem o aumento eficiência (GALLO, et al 2010).

Uma das dificuldades com o milho Bt é seleção de espécies resistentes que reduz a vida útil da tecnologia. Isso ocorre pela morte de indivíduos não resistentes e a seleção, seguida de reprodução de indivíduos resistentes que perpassam essas características para novos indivíduos que já carregaram essa capacidade (MENDES et al., 2011; ZANCANARO et al., 2012). Dentre as estratégias que poderiam ser

utilizadas nesta resistência seria o uso de áreas refúgios contendo o milho convencional (MENDES et al, 2011).

A substituição de agrotóxicos por milho Bt aconteceu de forma muito mais rápida que o esperado no Brasil, em 2013 já alcançava mais de 80% da área cultivada nacional. No entanto, o uso inadequado da tecnologia trouxe a proliferação das espécies de lagarta-do-cartucho já resistentes em território nacional. Sabe-se que pelo menos mais três espécies de lepidópteros também já se tornaram resistentes. Em outros países como EUA e Porto Rico, há relatos também de resistência. Em dois anos essas resistências passaram também para outro estágio, onde os insetos conseguiram uma vantagem de crescimento populacional nas culturas. Embora haja uma regulamentação de áreas de refúgio em outros países, o que coloca em atraso a política brasileira que não tem essas mesmas normas na agricultura. Essa forma de proteção sozinha não é suficiente para alcançar a desaceleração da evolução desses insetos. Em combinação com outras táticas, a descoberta de novas toxinas Bt é essencial para o processo de desenvolvimento de um meio eficaz para o combate aos prejuízos (WAQUIL *et al.*, 2016; TABASHNIK *et al.*, 2013).

Essa resistência pode ser atrelada pelos fatores também inerentes a própria espécie, como; ecológico e comportamentais, genéticos e outros fatores ligados as próprias plantas (MARTINELLI & OMOTO, 2005). Além da gama de hospedeiros disponíveis, a lagarta que no detrimento da fenologia das culturas atuais coloca as variantes de hospedeiros próximos e disponíveis (BARROS et al, 2010). Em um estudo foi verificado que os adultos de *S. frugiperda* tem um grande espectro de movimento, onde os machos poderiam atingir uma distância máxima de 806 metros e fêmeas 608 metros. Isto pode ser positivo já que pode reduzir a frequência de um alelo favorável para resistência, mas também pode não ser positivo se há uma troca de alelos resistentes (VILARINHO, 2011)

O controle destes insetos e suas fases é essencial para a produtividade da produção, como também para a demanda mundial pelos grãos e um desenvolvimento rentável da cultura para produtores e na renda nacional. Já que quando o ataque ocorre antes dos 30 dias a planta pode ter seu desenvolvimento totalmente comprometido e/ou a partir desta fase ter estruturas pertinentes ao seu desenvolvimento comprometidas. Há vários anos o controle prioritário desta infestação tem sido o controle químico. Ao todo 29 agentes químicos são registrados para este controle. Por safra são feitas quase três aplicações. Pelas características

de habitat e hábitos há um ciclo preocupante sendo formado, altas aplicações de pesticidas comprometem a biodiversidade que geraria uma pressão sobre os insetos, como também gera uma resistência. Esses fatores geram maiores aplicações que culminaram na necessidade mais agroquímicos (GALLO et al., 2002, VLAK, 1993; OMOTO *et al.*, 2013)

Os órgãos de pesquisas atualmente e apoio ao campo estão extremamente preocupados com reincidência de grupos de insetos resistente e a utilização de produtos químicos. Já que essa relação de mal uso dos produtos químicos está atrelada a diminuição da eficácia de outros modos de controle biológico. Há um interesse crescente pela redução direta de produtos fitossanitários, já que essa redução estaria atrelada há um planejamento e um controle de formas integradas. Essa tendência demonstra a necessidade de pesquisas nos âmbitos de agentes de origem biológica que atuam em conformação com o ecossistema atingindo diretamente as pragas (FIGUEIREDO et al, 2006)

1.3 Uso de inseticidas e necessidade novas alternativas

O controle dos insetos, devido a sua grande diversidade e capacidade de ação apresenta um grande impacto economia, já que podem ser patogênicos ou vetores de doenças, além de na agricultura causarem devastação pelas suas necessidades alimentícias. Devido a essa interferência nos faturamentos anuais, o controle de insetos cresce todos os anos (REGNAULT-ROGER, 1997). Os agrotóxicos, como são mais conhecidos, surgiram como uma alternativa, já que eliminariam as pragas que causam centenas de danos nas culturas anualmente. No entanto o termo “biocida” seria mais adequado para a definição dessas substâncias de controle (MORAGAS E SCHNEIDER, 2003)

“Praguicida” ou “pesticida” que também são termos utilizados, não exprimem a ideia de ação dessas substâncias, já que as mesmas não agem diretamente em seus espectros de especificidades, podendo também afetar organismos que não são as pragas para as quais as suas ações foram pré-determinadas. O termo agrotóxico, que é amplamente utilizado, teria surgido na década de 80, a partir dos movimentos ambientalistas, para dar uma conotação mais real e pejorativa dos produtos. Os biocidas, ou se preferimos, outras determinações de nomenclatura que afunilaram ou realçaram as especificidades do tema, não tem a capacidade de confinamento, ou

seja, não estão restritos aos seus locais de aplicação. Espalham-se pelos meios naturais, seja biológicos, químicos ou físicos. Dessa forma há uma contaminação dos recursos naturais e seres vivos através dos contatos com essas substâncias, já que esse contato é carregado de erros na escolha do produto, gerência da aplicação e excesso de uso, tornando essas substâncias um problema para a sociedade que consome esses alimentos e manipula essas substâncias (MORAGAS E SCHNEIDER, 2003)

O Brasil é o campeão mundial de utilização de agrotóxicos, consumindo 19% da produção mundial (ANVISA, 2010). Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente, através da legislação vigente é possível observar são produtos ou agentes de processos químicos, físicos e biológicos utilizados para o auxílio da produção desde a lavoura até o armazenamento e beneficiamento sendo estas nativas ou plantadas, de diversos ecossistemas ou ambientes, sendo capazes de alterar a fauna e flora. Além disso, seu comportamento no ambiente é complexo, pois possui capacidade para atingir, independentemente do modo de aplicação rios e solo, devido às chuvas e ventos. Nessa cadeia complexa na qual seu uso está inserido envolve transformações influenciadas por outros agentes em seu deslocamento e nas transformações que podem ser geradas, resultando em subprodutos, nos quais tem diferentes ações dos produtos iniciais, com propriedade distintas cujos danos também são diferenciados.

O mercado brasileiro de agrotóxicos tem crescido o dobro do consumo mundial ao longo das últimas décadas. Segundo a Agência de Vigilância sanitária (ANVISA), em o consumo chegou a ser de 936 mil toneladas na safra de 2010/2011, constituindo um problema de saúde aos que manipulação e consomem os produtos com agrotóxicos.

Entre 2007 e 2011, houve um aumento de mais de 50% de casos não fatais envolvendo agrotóxicos e o coeficiente de intoxicação aumentou em mais de 100%. Em 2011, quando alimentos foram analisados pela ANVISA, apenas 22% não tinha substâncias nocivas, inclusive, alguns tinham substâncias não autorizadas (Rigotto et al, 2014).

Quando observamos a ação dessas substâncias na agricultura, podemos verificar os impactos negativos que são gerados pela ação em predadores naturais da lagarta, interferências nos polinizadores que são essenciais para os sistemas, além da possibilidade de ação em organismos não-alvos, dentre tantos fatores um dos mais

importantes é a resistência que pode ser observada por meio de insetos que demandam aplicações cada vez maiores para ter os seus danos sanados (ISMAN, 2002; NEGRISOLI et al., 2010).

Os agrotóxicos mais utilizados são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Os organoclorados podem causar problemas endócrinos e se concentram a medida do consumo na teia alimentar, sendo quimicamente estáveis, tem a sua degradação de forma tardia, podendo ter o seu acúmulo também nas células do tecido adiposo (POOLPAK et al., 2008; TIEMANN, 2008). Os organofosforados, podem produzir interferências em órgãos vitais, produzindo sintomas ponderosos que podem levar a óbito, interferindo em respostas musculares (MULCHANDANI et al., 2001). Os piretróides tem seus efeitos em humanos ainda controversos, mas são altamente tóxicos e de fácil degradação, afetando diretamente os invertebrados marinhos. Os carbamatos são extremamente tóxicos, já que tem a sua ação no sistema nervoso central, com possibilidades de potencial cancerígena e mutagênico (SARAJI E ESTEKI, 2008).

Um grande número de agrotóxicos apresenta atividades potencialmente capazes de afetar o equilíbrio endócrino de seres humanos e animais, sendo essa exposição associada ao surgimento de vários tipos de cânceres, a modificação na razão entre sexos ao nascimento, infertilidade, má-formações congênitas no trato genital masculino e a modificações na qualidade do sêmen. Além de uma gama de problemas causados a nossa espécie, ainda é possível observar que a dinâmica bioquímica dos ecossistemas também sofre alterações, ou seja não há como mensurar especificamente as alterações nos seres bióticos e abióticos, o que surgirá dessas interações, numa escala temporal mensurável ou não (Ji et al. 2001, Alguacil et al 2000).

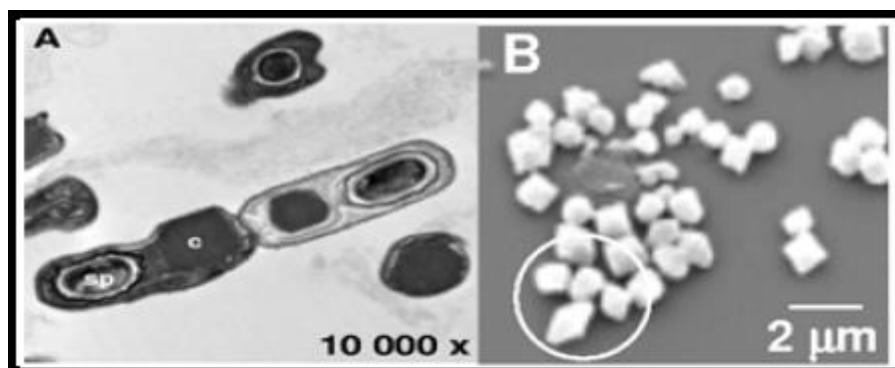
Esses abusos geraram problemas ambientais, ecológicos, e na área da saúde. Muitas vezes potencializados pelo uso excessivo, facilidade de aplicação, retorno produtivo mais rápido e falta de conhecimento dos reais atenuantes. Então a partir dos problemas gerados novas formas de controle que fossem menos abusivas e que oferecem riscos menores começaram a ser cogitadas. Começou uma discussão mundial e implementação de implementação do conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP), onde vários métodos são aplicados para o combate a pragas com o objetivo de uma maiores especificidades, entre estes está a utilização de entomopatógenos (GRAVENA, 1992).

1.4 Características gerais do *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria cosmopolita, classificada como gram-positiva, aeróbica, podendo em alguns casos crescer em anaerobiose. Bt pertence à família Bacillaceae que engloba a maioria das bactérias que produzem esporos. O bacilo é um bastonete gram-positivo com célula vegetativa de 1,0 a 1,2 μ m de largura por 3,0 a 5,0 μ m de comprimento e geralmente móvel. (Azevedo et al, 2000).

Segundo Lecadet *et al.* (1999), Xu e Côté (2008) a classificação das variedades de *Bt*, que é baseada nas propriedades bioquímicas e composição do antígeno flagelar 'H', contém 69 sorotipos H, 82 variedades sorológicas (sorovares) e 13 subgrupos antigênicos. Esta classificação demonstra o elevado grau de variabilidade genética apresentado pela espécie. Porém, não considera o perfil de toxicidade representado pelos tipos de endotoxinas proteicas apresentado pelas linhagens.

Figura 3 - Morfologia da célula vegetativa de *B. thuringiensis*. A) Célula vegetativa (sp. Esporo e c. Cristal); B) Cristais



Fonte: Foto de Swiecicka *et al.*, (2008).

Essas bactérias apresentam inclusões proteicas cristalinas altamente específicas que são produzidas na fase estacionária e de esporulação que são responsáveis pela atividade tóxica da espécie (BRAVO *et al.* 1998; SCHNEPF *et al.* 1998; ARONSON *et al.* 1986; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

A síntese do endósporo pode ser resumida de acordo com as fases convencionais de esporulação. O estágio I: formação do filamento axial, estágio II: formação do septo do pré-esporo; estágio III: formação do pré-esporo e invaginação da membrana e citoplasma. Já nos estágios IV a VI há formação do exósporo, parede celular primordial, córtex e capas dos esporos acompanhadas da transformação dos nucleóides. Já estágio VII ocorre a maturação dos esporos e a lise. Para Bt, além da

formação desse esporo, a partir da fase III, há a formação do cristal proteico (BECHTEL e BULLA, 1976).

A atividade entomopatogênica desses cristais é diversa podendo agir em diferentes espécies de insetos. As ordens que se destacam são lepidópteros, dípteros e coleópteros, podendo agir também em outras ordens como Himenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phythraphera e também para alguns nematóides, protozoários e ácaros, demonstrando a grande diversidade do espectro de ação das proteínas produzidas (BRAR et al., 2006; GLARE e O'CALLAGHAN, 2000)

A classificação do Bt está baseada em propriedades bioquímicas, como também a composição química do antígeno flagelar 'H' que são compostos de 69 sorotipos H, 82 variedades sorológicas (sorovares) e 13 subgrupos antigênicos. Diante desta classificação percebe-se o elevado grau de variabilidade genética apresentado por esta bactéria. Essa classificação não considera o perfil de toxidade apresentado pelos tipos de linhagens, já que o mesmo é definido pelas proteínas produzidas (LECADET *et al.* 1999; XU e CÔTÉ 2008).

Bt crescem em meio artificiais não tão complexos. Em certas condições adversas, como restrição de nutrientes ou acúmulo em seu metabolismo de componentes indesejáveis, a bactéria pode se manter em latência, na forma de endósporo (YAMAMOTO e DEAN, 2000; BRAVO et al, 2005). Dificilmente tem a capacidade causar uma doença contagiosa que atingiria diversos insetos, já que não uma grande agressividade na sua ação (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Há duas fases que compõem o ciclo de vida: a divisão celular vegetativa e ciclo de esporulação. A célula se divide simetricamente em duas células filhas por uma formação de um septo ao longo da membrana (BULLA, 1980). A divisão compõe sete estágios: no primeiro há a formação de filamentos, no segundo a formação do septo; no terceiro é onde ocorre as formações iniciais dos cristais paraesporais, nas etapas que seguem do quarto estágio até o penúltimo, há formação de exósporos com os componentes essenciais e no último estágio a maturação dos esporos e lise esporangial, resultando na liberação dos mesmos (BECHTE E BULLA, 1982).

Os esporos não têm a mesma resistência a radiação ultravioleta que os cristais, sendo estes mais efetivos na resistência. A atividade inseticida reflete a atividade específica dos cristais, embora esporos viáveis possam ocorrer em menor proporção. Essa característica de esporulação confere a resistência necessária para o seu uso amplo como agente biológico de maior potencial inseticida, já que pode ter suas

condições de crescimento mais adaptáveis na indústria. O destino e a permeância no ambiente ainda não são bem definidos. No entanto é observado que essas toxinas tem a capacidade de afinidade com microrganismos que dificultam a sua degradação e permitindo que a característica inseticida seja mantida. Nas folhas, por exemplo, os esporos se mantêm de 1 a 3 dias, e no solo que é de 100 a 200 dias (POLANCZYK & ALVES, 2003; MORAES et al., 1998).

1.4.1 Breve histórico

O uso de micro-organismos para o controle de determinados insetos não é uma abordagem nova. Já havia relatos de estratégias para controles de pragas em escritos antigos de egípcios e chineses. Uma das histórias faz o relato que jardineiros do Egito já manejavam coleções de bactérias afim de proteger jardins que circundavam túmulos e locais de moradia (CANDAS E BULLA, 2002).

A era do Bt se inicia no começo do século XX quando o cientista Shigetane Ishiwata, estudando uma doença do bicho-da-seda, consegue isolar a possível causa, uma bactéria que propagou a morte de um grande contingente de bichos. Inicialmente chamada de *Bacillus sotto* (Aoki e Chegâsaki, 1915).

Em 1911, ao estudar larvas de mariposa mortas, em um moinho de farinha, no estado alemão da Turíngia, o cientista Ernst Berliner isolou cepas que prontamente nomeou de *Bacillus thuringiensis*, verificando que havia corpos de inclusão (BERLINER, 1911). Esses corpos, anos depois, foram chamados de cristais paraporais (HANAY, 1953). Uma vez conhecidos como cristais, seguidamente a sua capacidade inseticida foi confirmada e verificada (ANGUS, 1953). E em 1955, se descobre que a composição desses cristais são proteínas (HANNAY E FITZ, 1955).

Sporine, foi o primeiro inseticida comercial feito à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), na França, para controlar mariposas de farinha. Nos Estados Unidos, os primeiros usos foram em 1958 e anos depois uma grade variedade já estava sendo registrada nacionalmente. Já em 1996, houve a grande evolução no uso, foram as chamadas culturas transgênicas, que incorporavam partes do DNA bacteriano e sua capacidade de resistência (QAIM E ZILBERMAN, 2003).

O uso de bioinseticidas de origem de micro-organismos que tem uma maior especificidade e uma proporção de danos bem diferente dos inseticidas químicos marcou com grandes importâncias a nova era contra as pragas. Os anos 80, foram

marcados por novas descobertas e técnicas científicas, voltadas, principalmente para o uso de DNA recombinante. Com esse desenvolvimento científico houve um crescimento das possibilidades de uso de Bt, já que já nessa mesma época se começa um questionamento sobre as especificidades dos usos dos inseticidas químicos. A partir destas inovações as entidades de pesquisa e científicas começam a cogitar e investir na aplicação das especificidades desta bactéria na agricultura e saúde (MORAES et al, 2015).

Ao longo dos anos Bt se tornou um dos organismos entomopatogênicos de maior importância. Do ponto de vista científico e industrial, esse desenvolvimento é conferido pelo modo de ação altamente específico, pela própria especificidade dos cristais e por haver características desejáveis que renderam respostas satisfatórias ao longo dos estudos. Destaca-se justamente pelos diversos estudos que renderam inúmeros sorotipos identificados, com grande importância na saúde pública e agricultura, sendo recomendado ao longo dos anos contra diversas ordens de insetos (GLARE & O' CALLAGHAN, 1998; JOUNG & CÔTÉ, 2000).

Para a produção dos esporos e cristais, são necessários componentes essenciais no meio de fermentação. É necessário que haja fontes de carbono e nitrogênio em um equilíbrio mineral para o balanceamento deste crescimento (ENNOURI, 2015)

1.4.2 O entomopatogêno de *Bacillus thuringiensis*

Devido a necessidade de uma agricultura mais sustentável e desenvolvida não com um fim em si, mas com consistente preocupação ambiental, tem se buscado formas alternativas e não agressivas de controle de insetos-pragas. O uso de bioinseticidas formulados baseados nas propriedades de Bt, vem contribuindo para uma possibilidade substituição dos inseticidas ou diminuição do uso dos mesmos em diversas áreas e culturas. Além da necessidade de incentivo de novas pesquisas em torno da sua utilização na agricultura (BOBROWSKI et al, 2003)

Há uma variedade de agentes microbianos sendo utilizados. No entanto, na família Bacillaceae, a espécie *B. thuringiensis* é a que mais se destaca já que tem um destaque de uso no mercado. Essa tomada de decisão pelas pesquisas sobre esta bactéria, não estão sem uma premissa, além da bactéria ter um grande espectro de ação, a nova necessidade mundial são níveis de resíduos menores e uma maior

eficiência que vinha sendo defasada ao longo dos anos por outros métodos (BERLINER, 1915; VALADARES-INGLIS et al., 1998; MELO e AZEVEDO, 1998).

A formulação de bioinseticidas a base de Bt está no favorecimento pelas suas toxinas e especificidade no controle de insetos-praga. Desde o primeiro produto que foi na década de 30 na França, mais de 300 produtos à base Bt foram lançados, esses produtos são responsáveis por mais de 50% do comércio mundial de bioinseticidas. No entanto, essa participação diminuiu na primeira década deste século, antes havia uma prevalência mais específica que foi difundida ao longo dos anos. Essa redução ocorreu devido ao desenvolvimento e investimento em outros entomopatogenos como vírus e fungos na agricultura. O uso de Bt teve o aumento de 36% em sua produção e uso. O continente americano e o Canadá são responsáveis por metade desse mercado. Já a América Latina chega a somar de 8 a 10% desse mercado (TAMEZ-GUERRA et al., 2001).

Na natureza, o controle de insetos ocorre através de seus predadores e parasitoides. Foi estudado em condições laboratoriais e em campo, o efeito da toxicidade de Bt contra os inimigos naturais dos insetos praga (WRAIGHT et al., 2000).

1.5 Produção de toxinas

A bactéria *B. thuringiensis* produz cristais proteicos com atividades entomopatogênica específicas que ocorrem durante a esporulação. Esse processo ocorre pela codificação de genes específicos. Essas atividades inseticidas que são realizadas pelas proteínas conferem a ação tóxica a diversos insetos. Existem, hoje, mais de 390 sequências de genes identificadas, formando 54 famílias e diversas subclasses (CRICKMORE et al., 2018).

B. thuringiensis produz uma grande diversidade de fatores de virulência. Basicamente podemos denominar as três proteínas tóxicas principais que atingem uma grande variedade de insetos como: Cry, Cyt e Vip, além de outras toxinas como: α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases, nas quais também apresentam atividade inseticida. Na fase de crescimento vegetativo podem haver a produção de toxinas chamadas VIP. Os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e nematoides tem, por exemplo, uma especificidade ao grau de toxicidade das proteínas Cry, já a ordem Diptera, na maioria

das vezes tem efeito pela ação tóxica das proteínas Cyt (BRAVO et al., 2011; SOBERÓN et al., 2012; HANSEN & SALAMITOU, 2000).

Bt tem uma atividade inseticida amplamente conhecida. Essas características advêm dos cristais proteicos compostos por proteínas sintetizadas durante a fase estacionária. Esses cristais são formados pelo acúmulo dessas proteínas e compostos por umas das classes de proteínas produzidas pela bactéria que eram denominadas apenas de δ -endotoxinas que estão divididas em dois tipos: proteínas Cry (*crystal*) e Cyt (*cytolytic*), codificadas pelos respectivos genes. Esses cristais são facilmente observáveis na visualização em microscopia, onde é possível fazer distinção nas suas formas. (Schnepf et al. 1998; YAMAMOTO e DEAN, 2000). Os genes cry e sua toxicidade estão ligados a porção N-terminal, já a porção C-terminal determina a forma da estrutura. O isolamento e caracterização dessas proteínas é essencial para o desenvolvimento de inseticidas específicos (BAUER, 1995; LI et al., 1991).

Uma determinada cepa pode produzir um ou mais cristais. A partir desse cristal pode haver mais de uma toxina que pode variar peso. Isso pode ser observado em *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 que contém três proteínas Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70 kDa) (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000). Essa expressão de proteínas está regulada em basicamente dois mecanismos. O primeiro é a dependência de fatores sigmas específicos da expressão da fase de esporulação. O segundo é a não dependência desse fator no processo de esporulação, como o gene vip3 que tem sua expressão na fase de crescimento vegetativo. Algumas cepas podem apresentar um único gene de codificação e outras mais de um que estão relacionados (VALADARES-INGLIS et al., 1998; LERECLUS et al., 1993; SANCHIS et al., 1998).

Quanto a localização dos genes que determinam essas proteínas, os mesmos podem estar contidos em cromossomos ou em megaplasmídeos, mas também podem estar contidos em ambos (GONZÁLES et al, 1982). Existem cepas que possuem apenas um gene codificador de proteínas, mas outras apresentam genes que diferentes, mas que podem ser relacionados. As proteínas tóxicas recebem o mesmo nome dos genes das quais são produtos, variando apenas a forma escrita, ou seja, as proteínas são escritas com a primeira letra maiúscula, enquanto os genes são grafados todos em minúscula e em itálico. Por exemplo, Cry1Ab e gene cry1Ab (POLANCZYK e ALVES, 2003)

A classificação é feita por um sistema de similaridade de aminoácidos. Se a similaridade de sequências é maior que 45% do que em outros membros da classe as

proteínas Cry e Cyt foram atribuídas a uma mesma classe. Os sistemas numerais antes romanos, passaram a ser substituídos por numerais arábicos.

Na maioria dos casos, o pH do intestino dos insetos vulneráveis é elevado. Nesta condição os esporos não capazes de germinar. No entanto, as endotoxinas paralisam o intestino, quando são solubilizadas e proteoliticamente convertidas em peptídeos menores no trato digestivo. Essa paralisia gera uma mistura na hemolinfa que por conseguinte diminui o pH, essa diminuição fornece condições ideais para germinação dos esporos. Assim o inseto e a porção infectada servem como fonte de crescimento vegetativo (KNOWLES, 1994). É importante ressaltar que as diferentes toxinas, também podem ter receptores diferentes. Esses receptores diferentes é que agem em espécies específicas, implicando na especificidade. Devido a este processo de ação, os bioinseticidas além de terem na sua composição as toxinas, contém também os esporos para aumentar toxicidade (COPPING & MENN, 2000; SCHNEPF et al., 1998)

As etapas da patologia contra insetos começam com o aumento da absorção de glicose e início dos sintomas que duram em torno de 5 minutos, após essa etapa a paralisia do intestino médio onde as protoxinas convertidas se ligam as microvilosidades apicais das células do intestino, ou seja, o processo de alimentação cessa, a membrana apical permeável a corantes é afetada pela diferença osmótica criada pelos poros, aumentando o volume e vesículas nas células começam a crescer. A hemolinfa tem o seu pH alterado, gerando uma diminuição de glicose e leucina para a hemolinfa, ou seja, há o início de um colapso metabólico a partir de 10 a 30 minutos, onde as funções estabelecidas e necessárias para as funções vitais começam a ser afetadas. Em torno de 1 a 7 horas a membrana basal está totalmente rompida e lise celular. Todos esses processos vão acarretar na falta de capacidade de se alimentar ou septicemia que em torno de 1 a 3 dias levarão o inseto a morte (KNOWLES, 1994; FIUZA et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998).

1.5.1 Proteína cry

No início da esporulação há uma grande quantidade de proteínas que é sintetizada, essas proteínas possuem atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusões cristalinas no interior da bactéria. Por essa característica são denominadas proteínas Cry (YAMAMOTO e DEAN, 2000). Uma das

definições mais condizentes com essas toxinas é que uma proteína é considerada Cry, quando forma cristal, ou seja, uma inclusão paraesporal, formulando algum grau tóxico a insetos alvos, ou ainda tem uma sequência de aminoácidos similares a uma proteína Cry já descrita (BRAVO et al, 2007; SCHNEPF, et al, 1998).

As proteínas Cry1 apresenta peso entre 130 e 140 kDa, sendo umas das principais em apresentar características contra insetos pragas, com importância econômica, tendo seu armazenamento em cristais bipiramidais. Os genes cry são responsáveis por quase metade dos genes caracterizados por terem uma maior frequência. Em relação ao modo de ação dessas, a complexidade da ação dessas proteínas contra insetos é objeto de vários estudos que tentam desvendar e elucidar questões importantes do processo de ação. Apesar das pesquisas estarem muito avançadas ao longo desses anos, há muitas questões que ainda não ficaram claras (SENA et al., 2009; CHAKROUN e FERRÉ, 2014; CRIALESI-LEGORI et al., 2014). De um modo geral, é aceito que há uma conversão desses fragmentos tóxicos pelas enzimas digestivas de insetos que tem afinidade, posteriormente ligações são feitas com as células, causando morte das mesmas, o que leva numa morte por disfunção (DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2005; HÖFTE; WHITELEY, 1989).

A massa molecular das proteínas Cry varia entre 40 e 140 KDa. A molécula destas proteínas tem forma globular. Que são formadas por domínios estruturais ligados por pontes. Seis proteínas Cry foram determinadas em suas estruturas por cristalografia em raio-X. Entre elas foi encontrado um alto grau de similaridade, principalmente entre seus domínios. O domínio I, é composto pela extremidade N-terminal, sendo formado por cadeias polipeptídicas que tem a estrutura em α -hélice, no qual se mantém no centro e é hidrofóbica, com mais seis marginais cercado. O domínio II é composto por três cadeias polipeptídicas antiparalelas com estrutura folha β pregueada, enquanto que o domínio III apresenta estrutura tipo β sanduíche (BRAVO et al, 2007)

Essas proteínas são sintetizadas em forma de pro-toxinas. Dessa forma, a sua ação tem uma dependência aos processos de ativação da toxina. Esse processo de ativação ocorre no interior do inseto, ou seja, há uma especificidade. Há dois modelos, mais aceitos, baseados em dados experimentais, das toxinas Cry. As primeiras etapas dessas formas de ativações são semelhantes. Onde as toxinas passam pela solubilização, com afinidade ao pH alcalino, para só então as protoxinas serem liberadas e serem crivadas por proteases (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007). O

modelo de ação proposto é a “formação de poros, esse modelo é o mais antigo proposto e parece ser o mais comum entre as ordens de insetos, após o processo de solubilização inicial as proteases clivam a porção N-terminal, já a porção C-terminal torna-se uma toxina ativa, onde o domínio I, da porção N-terminal composto de alfa-hélices começa a realização dos poros. Já os domínios II e III fazem parte da porção de reconhecimento, além do domínio III também ser responsável pela formação de poros (DE MAAGD et al., 2001; BRAVO et al, 2007; BRAVO & SOBERÓN, 2008).

Neste modelo, essa clivagem, resulta na forma oligomérica da toxina. Os oligômeros possuem afinidade por receptores secundários como aminopeptidases-N (APN) e fosfatase alcalina (ALP), que estão ancorados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BRAVO et al., 2004). Depois esses oligômeros se ligam a receptores secundários, criam os poros na membrana apical das células, essa ruptura causa uma diferença do potencial osmótico, essa diferença gera um fluxo diferente que rompe as células, culminando então no processo de morte (ZHANG et al., 2006; BRAVO et al., 2004).

O outro modelo aceito é nomeado “transdução de sinal”, mas foi estudado em apenas poucos insetos-alvo. Nesse modelo de ativação é devido uma cascata de ativação pela interação da toxina com o receptor primário de cadenina. Onde uma série de reações intracelulares são induzidas, uma delas é ativação da proteína G e a adenilato ciclase, aumentando a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. O aumentando dos níveis de AMP cíclico ativa a proteína quitinase A, a qual ativa a via intracelular celular, aumentando a pressão interna. Esse desequilíbrio danifica as células e gera a morte dos insetos (BRAVO e SOBERÓN, 2008 ZHANG et al., 2006).

A formação dessas proteínas Cry é determinada por genes cry. Na cepa de *B. thuringiensis* pode haver especificidade de um gen ou mais, gerando a diversidade de proteínas Cry e de diferentes fatores de toxicidade. Além da formação de diferentes cristais. É nos plasmídeos que na maioria das vezes estão os genes cry, esses plasmídeos tem a capacidade de conjugação. Essa capacidade de conjugação pode resultar na passagem destes plasmídeos de uma linhagem para outra. Esse processo resulta em espécies cada vez com uma maior diversidade de genes e capaz de uma maior variação do seu perfil tóxico, independente dos modelos e das especificidades das suas ações. O resultado é a paralisia do sistema digestório. Essa paralisia geral dos músculos gera a morte. (BRAVO et al, 2007; BRAVO e SOBERÓN, 2008; HABIB e ANDRADE, 1986; VALLETE-GELY et al, 2008; VILAS-BÔAS et al 2007).

Os genes cry, em sua maioria, tem uma co-dependência com a esporulação. Já que os genes cry necessitam de um fator sigma que começa a ser produzido na fase de esporulação. Por isso, a maioria dessas proteínas formadoras do cristal serão secretadas nessa fase. No entanto, há uma parcela desses genes que não é regulada pelo fator na esporulação, sendo expressos também na fase de crescimento vegetativo. Em ambos os casos de dependência ou não do fator as proteínas são constituições do metabolismo secundário (ARANTES et al., 2002; LERECLUS et al, 1993).

1.5.2 Proteína Cyt

As proteínas Cyt são definidas como proteínas que tem a atividade hemolítica que compõem uma inclusão para esporal de *B. thuringiensis*. Como também alguma proteína que apresente sequência de aminoácido que tem semelhança com outras proteínas Cyt já descritas. O fungo *Volvariella volvacea* produz uma toxina chamada valvatoxina que tem uma similaridade cm essas proteínas. Há apenas um domínio que forma as proteínas Cyt, apresenta duas cadeias externas em forma de α -hélice, e uma cadeia interna em forma de β -folha pregueada. Atualmente são conhecidas 27 proteínas Cyt (BRAVO, 2007; CRICKMORE et al., 2018)

As Cyt, assim como as proteínas Cry, também tem a sua síntese na forma de protoxina. Também no interior do inseto tem sofrem processos de ativação que resultaram na clivagem da porção C-terminal e N-terminal. Nesses processos a toxina ativa é liberada. No caso das proteínas Cry, há uma ligação a receptores de conformações específicas. Já as proteínas Cyt, terão essa ligação aos lipídeos componentes da membrana celular. Após essa ligação também é induzido a formação de poros, como também a desestruturação da estrutura da bicamada lipídica gerando uma pressão osmótica e levando as células a lise. Todo esse processo acarreta também na morte de insetos-alvo (BRAVO, 2007)

Pela similaridade na ação e pelo resultado dos processos celulares que levam a morte dos indivíduos. Uma grande diversidade de estudos tem demonstrado uma ligação sinérgica entre as proteínas Cry, já que há uma similaridade da ação das mesmas. Esses resultados têm demonstrado uma capacidade de associação entre os resultados. Dessa forma, as interações entre elas geram um maior efeito de

toxicidade, onde uma potencializa o efeito da outra. Alcançando um maior potencial de eficiência na morte dos insetos (BRAVO, 2007; ÖSKAN et al., 2003).

1.5.3 Proteínas Vip

Muitos isolados de *B. thuringiensis*, produzem outras proteínas que são chamadas de Vip (vegetative insecticidal proteins). A síntese ocorre na fase vegetativa do crescimento. A sua descrição ocorreu em 1996 por Estruch et al. Essas proteínas não integram o cristal proteico, mas podem contribuir para ação tóxica de das linhagens já que possuem efeito similares as proteínas Cry. No entanto, não tem homologia de sequência ou estrutura. Em alguns estudos podemos observar as ações desta proteína inseticida contra coleópteros (Vip1 and Vip2) e lepidópteros (Vip3), as quais podemos observar o favorecimento e intensidade de ação em favor da toxicidade das proteínas Cry (ESTRUCH et al., 1996; CHEN et al, 2003; SHI et al., 2004). Yu et al. (1997) demonstram que a forma de ação dessa toxina também resulta na ruptura das células do intestino dos insetos. Sendo essa uma forma de ação primária que lisa as células e que gera a morte dos insetos.

A estrutura de proteína binária é formada pelas classes Vip1 e Vip2 com atividade de ação contra larvas de coleópteros (WARREN, 1997; LEUBER et al., 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009). A proteína Vip3 tem um grande espectro de ação contra uma grande gama de insetos, tendo uma importância agrônômica da ordem Lepidoptera, com alta atividade inseticida para: vários insetos (ESTRUCH et al., 1996; LIU et al., 2007).

1.6 Etapas da produção

Embora haja muitos estudos que sintetizem formas e componentes da produção de *B. thuringiensis*, os dados não são tão conclusivos enquanto a produção, já que em alguns casos esses dados são segredos industriais. Em geral, os produtos que tem Bt na composição são compostos por cristais, esporos, poucas células vegetativas e alguns ingredientes específicos (CAPALBO et al, 2004). As principais etapas são: seleção da cepa, estocagem, processo fermentativo, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto (fórmula e componentes) e análise de qualidade (MORAES et al, 2001; COUCH, 2000).

Existem critérios específicos para a produção de bioinseticidas a base *B. thuringiensis* que são espectro de ação, potência por unidade de volume da cultura, requerimentos nutricionais, facilidade de produção, estabilidade genética e facilidade de estocagem. O processo de estocagem é essencial, já que a linhagem não pode deteriorar o seu potencial tóxico e capacidade de crescimento. Essa bactéria tem uma grande troca de plasmídeos, fator que é de grande importância da diversidade, mas em sucessivas fermentações pode gerar perda da ação tóxica, sendo necessário um acompanhamento durante e após os processos de fermentação, além da necessidade de uso de novas cepas isoladas (COUCH, 2000; BIZARRI et al., 2008).

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

A fermentação submersa (líquida) contínua é processo mais comum na produção de Bt, esse processo também é conhecido com batelada. Nesse tipo de fermentação, um recipiente contém o meio de cultura líquido, é nesse recipiente que a bactéria é inoculada, durante o processo não acréscimo ou retirada significativa do meio de crescimento. Portanto, todo o desenvolvimento da cultura ocorre em um mesmo local e todas as fases de crescimento são no mesmo recipiente. Apenas o produto final é retirado. Em geral, as proteínas mais usadas, as Cry, são formadas ao final da fermentação, quando as condições de nutrientes já não são as mesmas e não satisfatórias para o microrganismo. Desta forma esse processo de produção é muito importante (MORAES et al, 2001). Algumas pesquisas têm testado as fermentações sólida, contínua e batelada alimentada. Porém, o crescimento em batelada submersa ainda é o mais satisfatório (ADAMS, 2002; CHEN et al, 2003, MORAES et al, 2001).

Em média, *Bacillus thuringiensis* apresenta 50% do seu peso em esporos e cristais no final da fermentação. A microfiltração e centrifugação são os métodos mais comuns de recuperação de cristais e esporos, mas há uma grande diversidade de técnicas para este processo. Esses processos permitem, em sua maioria, a

recuperação primordial de proteínas Cry. Atualmente outras formas de recuperação, como também concentração estão sendo desenvolvidas para auxiliar ou substituir as mais utilizadas. Podemos destacar entres elas a liofilização e a flotação (BRAR et al., 2006; COUCH, 2000).

Após a recuperação de metabolitos de interesse para a produção da toxicidade do bioinseticida. O produto passa a ser formulado. A formulação tem três objetivos: conferir estabilidade ao produto durante a estocagem e aplicação, facilitar a aplicação do produto e proteger o microrganismo e os cristais das condições adversas do ambiente (BRAR et al., 2006; COUCH, 2000). Embora essas formulações sejam secretas, devido ao seu valor comercial, é possível entender alguns produtos presentes no formulado. Há algumas combinações de aditivos reconhecidos que são reconhecidos pela USA/FDA (Food and Drug Administration) ou pelo órgão específico de cada nação. É comum o uso de dispersantes, protetores e surfactantes (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000; BRAR et al., 2006)

O produto formulado, antes de ser comercializado, deve passar por testes de análise da qualidade. Principalmente para testarem os seus efeitos tóxicos. Geralmente o processo de toxicidade é avaliado em bioensaios contra o inseto-alvo (COUCH, 2000). A sua efetividade não se restringe a teste de tóxicos somente. São necessários testes que a garantam a segurança ambiental e à saúde humana. Em geral, o bioinseticida é testado em mamíferos sadios e imune-suprimidos, sendo expostos à exposição dérmica, ocular, inoculação intraperitoneal e subcutânea. Em relação a capacidade de prejuízo ambiental são feitos testes de exposição ao produtor com sobre aves, vertebrados aquáticos, invertebrados, incluindo insetos não-alvo, vegetais e até mel de abelhas para garantia de uma grande variedade de capacidades de contaminação. Nestes testes não devem indicar nenhum tipo de efeito adverso de importância através dessas exposições aos organismos. A não toxidade desses testes garante a segurança ambiental nas aplicações futuras. Os testes são regulados pela Agência de Proteção Ambiental (US-EPA) e departamento de agricultura dos estados, nos Estados Unidos, no qual a regularização ocorre através de licenças. No Brasil, também são exigidos testes específicos, onde a licença é expedida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (VILAS-BÔAS et al, 2007; COUCH, 2000).

1.7 Meios de cultura

Para o sucesso nos processos de fermentação e obtenção da produção de proteínas com atividades entomológicas é necessário um meio de cultivo adequado para o crescimento e desenvolvimento metabólico das bactérias. Além desse meio proporcionar uma condição de cultivo adequada, ele precisa ser produtivo, ou seja, menos recursos, menor custo e maior ação de produção. Geralmente, fontes de nitrogênio, carbono e sais minerais são componentes essenciais do meio. Em alguns casos são adicionados tampões para estabilização do pH e anti-espumantes para otimizar os meios. O carbono é a fonte de energia para o crescimento e desenvolvimento, além de ser um componente essencial para as funções de desenvolvimento celular. Para a síntese das proteínas que são essenciais para o processo de ação desta bactéria e dos ácidos nucleicos são requeridas quantidades de nitrogênio. A osmolaridade celular é importante para o controle do metabolismo, sendo os sais minerais essenciais nesse controle, além de atuarem como co-fatores importantes na célula (COUCH, 2000).

A fonte de carbono para o crescimento desta bactéria pode variar de acordo com o objetivo da fermentação e com a necessidade da linhagem cultivada. Por terem etapas e fases do metabolismo, a fonte que mais se adequa ao crescimento vegetativo normalmente não tem a mesma eficiência para o crescimento de cristais e esporos. Por isso, é necessário a adaptação dependendo das condições para as quais a fermentação é feita. Por exemplo, a glicose do amido e melão não tem um efeito desejado já que suprimem o desenvolvimento das proteínas Cry. Já a lactose, sacarose, dextrina, aveia, maltose, glicerol e insulina são as melhores fontes de carbono para o crescimento dos cristais de atividade inseticida e os esporos (IÇGEN, 2000; ÖSKAN et al., 2003).

Glicose, amido e melão resultam na produção ineficaz das proteínas Cry em particular da proteína Cry4B (134KDa). Essa capacidade repressora seria nas etapas da fosforilação da proteína quinase Calfostina C, essa proteína participa da síntese das protoxinas Cry. Segundo Öskan et al. (2003), dextrina é a fonte de carbono mais promissora para produção de toxinas e esporulação. Vora e Shethna (1999) e Prabakaran et al. (2004) relataram que o melão é fonte de carbono importante para as toxinas. Assim, cada subespécie de Bt apresentem necessidades de fontes de carbono diferentes para o crescimento e produção de endotoxina.

As fontes de nitrogênio podem ter sua origem de forma orgânica ou inorgânica. No entanto, geralmente, são usadas as duas formas. Apenas uma fonte não é suficiente para as demandas de crescimento e esporulação. Quando usado apenas nitrogênio inorgânico houve um crescimento retardado, desaceleração da biossíntese e queda na esporulação. As fontes mais promissoras deste componente que tem se destacado é o fosfato de amônia monobásico e dibásico. Esse destaque se deve ao aumento da produção de toxinas (Içgen et al, 2002, Öskan et al., 2003).

Entre as fontes orgânicas de nitrogênio, o extrato de levedura é bastante utilizado no cultivo de *B. thuringiensis*. Peptona e derivados de soja apresentam resultados satisfatórios (VORA e SHETNA, 1999; IÇGEN et al, 2002; MORRIS; DEAN, 1997). Como fontes alternativas, vêm se destacando farinhas derivadas de proteína animal (farinha de peixe e de crisálida) e alguns cereais (cevada e trigo) (DEVI et al, 2005; GHRIBI et al 2005; PRABAKARAN; BALAMARAN, 2006).

O extrato de levedura é uma das fontes mais utilizadas de nitrogênio orgânico em meio de cultivo. No entanto peptona e derivados de soja, também apresentam resultados importantes (VORA e SHETNA, 1999; IÇGEN et al, 2002; MORRIS & DEAN, 1997). Como alternativa a essas fontes mais conhecidas, destacam-se: farinhas derivadas de proteína animal (farinha de peixe e de crisálida) e alguns cereais (cevada e trigo) (DEVI et al, 2005; GHRIBI et al, 2005; PRABAKARAN & BALAMARAN, 2006).

É comprovada a diferença na osmolaridade pela concentração dos sais no meio de cultivo. Apesar deste consenso sobre a necessidade, o mesmo não existe quando se fala em proporções adequadas, como também quais sais seriam essenciais para manter a osmolaridade (IÇGEN et al, 2002). Arcas et al (1987) obtiveram uma boa produção de toxina com um meio contendo osmolaridade de 808 miliosmol. Esse trabalho foi utilizado como um parâmetro clássico de aceitabilidade para o crescimento e produção de toxina. É de suma importância ressaltar que cada íon fornecido por esses sais pode ter ações diferentes, mesmo a finalidade seja a ação na osmolaridade. Muitas vezes um íon pode beneficiar um parâmetro específico, mas trazer prejuízos ou nenhuma ação em outro. ÖSKAN et al. (2003) e IÇGEN, et al, (2002) colocam o manganês como um dos principais sais, já que o mesmo é essencial para diferenciação celular, sendo também um componente participativo na produção de toxinas e esporulação. As melhores concentrações para os resultados esperados

foram de 10^{-6} e 10^{-4} M, já que quando esses valores são mais elevados prejudicam os processos celulares, se tornando tóxicos.

O magnésio também influencia no metabolismo secundário, sendo componente necessário para produção de proteínas. A concentração otimizada vai de 10 a 3 M. O cálcio é promovido a estabilização dos cristais proteicos, sendo um componente essencial para a capacidade inseticida de Bt. Quando em concentração de 10 a 3M age como estímulo para a esporulação. No entanto, acarreta na contrariedade ao crescimento vegetativo e síntese de proteínas. Dessa forma, diversos estudos têm requerido concentrações menores para não comprometer a síntese dessas proteínas Cry, já que parecem não ter uma dependência desse componente, pois não poderão serem estabilizadas se não tiverem sido produzidas. O crescimento, a esporulação e a síntese de proteínas são prejudicados com o acréscimo de metais como: zinco, ferro e cobre. Mesmo em concentrações menores, os resultados não foram satisfatórios. Diante destes fatores é necessária uma constante aplicação de resultados que expressem inovações e diferenças nos complexos participantes dos meios de cultivos para que se possa avaliar e otimizar a sua produção (IÇGEN et al, 2002; ÖSKAN et al., 2003).

1.7.1 Uso de resíduos ou subprodutos agroindustriais

Em um processo de geração de lucros, se fazem necessário valores de produção cada vez menores. É importante ressaltar que se adequem as condições de cultivo às condições locais afim de diminuir os custos de produção. Sendo o processo de fermentação um componente essencial para as etapas posteriores de uso das toxinas e esporos produzidos. É considerável que as condições de fermentação sejam potencializadas com ingredientes mais acessíveis para que o processo de produção seja mais barato.

Abdel-Hameed (2001) realizaram experimentos com ingredientes de fermentação de baixo custo e da sua determinada localidade onde o trabalho estava sendo desenvolvido. Além de serem de baixo custo, deveriam fornecer condições ideais de nutrientes para o cultivo. Os bioensaios foram realizados contra mosquitos. Foi utilizado grão de feijão preto, ervilhas e lentilhas, as quais apresentaram um fornecimento satisfatório em oposição a outras substâncias como amendoim, levedura alimentar, soro de queijo e xarope de milho que proporcionaram pouca quantidade

toxinas. Melaço com concentrações entre 2 e 3% para fornecimento de carbono e soja com concentração em torno de 3% para fornecimento de carbono proporcionou um melhor rendimento de toxinas para as linhagens específicas.

Na obtenção de bioinseticida a partir de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti), Ernandes (2004) utilizou subprodutos industriais e resíduos como meio de cultivo, sendo eles água de maceração de milho (milhocina) e um subproduto do processo de produção industrial do milho (maniqueira), um subproduto do processamento de mandioca e sangue bovino dos processos de abate de matadouros. A maniqueira não demonstrou mudanças significativas no processamento, todavia para o seu uso há necessidade de esterilização. Já o sangue bovino demonstrou a promoção de uma maior eficiência do meio de cultivo.

No uso de da composição por meio formulado a base de caldo de cana de cana, extrato de levedura e sulfato de amônio. Sendo que essa composição elevou a concentração residual de sacarose P.A, já que há elevadas concentrações no caldo e na sacarose. Essas altas concentrações indicam que para essa subespécie há uma dificuldade em metabolizar dissacarídeos (Pessanha, 2008). As matérias primas mais utilizadas para o crescimento de Bt em seus meios de cultivo são: são farelo de soja, água de maceração de milho, melaço, farelo de semente de algodão, farelo de feijão, caseína e farinha de peixe. Perini (2014) pontua que leite UHT pode também ser utilizado para o crescimento de Bt.

Ângelo et al. (2010) apresentam os ingredientes que são mais aplicados no cultivo alternativo de bactérias entomopatogênicas e suas aplicações mensuradas no cultivo de Bt na América do Norte. Além disso, faz o comparativo entre diversos meios de cultivo não convencionais, tais como: à base de batata, extrato de soja suplementado com cistina, à base de água de coco, águas residuais de indústrias e de estações de tratamento de água, sendo alcançados resultados expressivos com os mesmos.

Muitos estudos também estão utilizando como meio de cultura alternativo águas residuais provenientes de indústrias e estações de tratamento, esses trabalhos apresentam parâmetros e resultados positivos em suas produções. Muitas produções laboratoriais já utilizam desses meios como alternativa (MONTIEL et al., 2001; VIDYARTHI et al., 2002; YEZZA et al., 2006; CHANG et al., 2008).

Com a finalidade de diminuir custos na produção total de produtos formulados a partir de *Bacillus thuringiensis* tem se investido constantemente na produção e avaliação que utilizam meios alternativos e de origem regionais.

2 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de insumos agrícolas essenciais, produtos que tem um impacto mundial pelo seu uso. O milho (*Zea mays*) um dos produtos produzidos nacionalmente que tem grande importância econômica. Com dados do último ano o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial, com uma safra que chegou a mais de 84 milhões de toneladas. O milho está no prato de milhões de brasileiros diretamente ou através dos seus subprodutos em diversas receitas nacionais. Entretanto, é utilizado na ração de animais, e na fabricação industrial de vários produtos. Apesar dos números alcançarem a casa dos milhões estima-se que a produção poderia ser muito maior se houvesse investimento em tecnologia e controle de pragas.

Há uma estimativa de que existem mais de 2 milhões de espécies consideradas pragas que causam danos ou perdas na agricultura ou na pecuária. A agricultura gera um impacto ambiental, já que os sucessivos plantios afetam o processo de seleção natural, colaborando para o aumento e diminuição de determinadas espécies. As pragas surgem nos contextos de espécies que se alimentam e causam danos secundários as plantas que possuem importante valorização econômica. Geralmente, os agentes das pragas tem um grande sucesso habitacional e a capacidade de adaptação as dificuldades dos ambientes naturais. Portanto, pela diminuição da geração de lucro se fazem necessárias novas alternativas de controles que interfiram no ciclo dessas espécies.

A produção do milho tem tido severas quedas devido a percas sofridas pelos ataques de pragas. A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é classificada como uma das principais pragas que atacam a cultura do milho, e a qual demanda um alto investimento para o seu controle. Ela tem uma grande variação de hospedeiros e uma taxa de reprodução alta. Além de terem a sua localização no hospedeiro em áreas difíceis de serem tratadas. O ataque desta praga pode ocorrer em qualquer estágio do cultivo. Dependendo da quantidade da população e estágio da ação os danos são irreversíveis.

Estima-se que 500 milhões de reais ao ano sejam perdidos pela ação da lagarta do cartucho. Existem estudos sobre diversas formas de controles. No entanto o controle químico ainda é o principal método utilizado. Pela reincidência da praga, muitos produtores aplicam quantias predeterminadas sem seguir as especificidades

dos seus cultivos. Muitas vezes as pragas reincidentem e os produtores optam pelo uso de quantidade ainda mais elevada dos agrotóxicos, chegando a fazer mais de 10 aplicações, mas apenas duas são recomendadas. Esse uso pode gerar a resistência dos insetos e a morte de insetos secundários que são de suma importância para a lavoura, como também danos ambientais, como a contaminação de nascentes, até danos à saúde de produtores e o desenvolvimento de tumores. Esses produtos são altamente tóxicos, inexpressivamente específicos e de efeito residual acumulativo.

Os bioinseticidas são produtos de origem biológica que tem como finalidade serem mais específicos na sua ação, menos agressivos ao meio ambiente e também a saúde humana. Todavia, seu uso representa apenas 5% do controle de pragas do mercado mundial. Dentre os organismos empregados no controle biológico, as bactérias se destacam, a exemplo do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria gram-positiva que produz esporos e que durante sua fase de esporulação produz inclusões cristalinas (proteínas Cry e Cyt) e na sua fase vegetativa produz algumas proteínas. Essas proteínas e seus esporos são responsáveis pela atividade entomopatogênica. As proteínas cristal ou endotoxinas são codificadas por genes denominados *cry*, *vip*, *cyt*, e podem ser patogênicas aos insetos das ordens Lepidoptera, Díptera e Coleoptera, ordem Acari e filo Nematoda. Essas proteínas no interior desses animais através das proteínas e esporos que ao entrarem em contato com o lume do intestino levam à morte. Entretanto, esse mecanismo de ação não eficaz em outros organismos.

Apesar da grande vantagem em suas aplicações, algumas limitações precisam ser avaliadas e sanadas para a maior eficiência quando em contato com o meio ambiente. Uma das limitações é o alto custo da produção para os formulados e um preço final que não é atrativo para os produtores. Os meios de cultura fornecem os nutrientes necessários para que a bactéria se desenvolva, mas são necessárias grandes quantidades dos mesmos em escalas de produção industrial e as necessidades nutritivas para as etapas do seu crescimento, nas fases de esporulação e de produção das toxinas precisam ser alcançadas. Esses meios de fermentação afetam diretamente o custo da produção final, pois os meios padrões são mais caros e geralmente são segredos de grandes indústrias. O valor do meio pode acarretar de 30% a 40% da produção, já que devem proporcionar maior produtividade. No entanto a partir do padrão específico das necessidades de fontes de carbono, nitrogênio e sais

minerais, são fornecidas possibilidades de meios alternativos de baixo custo e alta produtividade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e manutenção

O *Bacillus thuringiensis* cepa 370 foi obtido da Coleção de micro-organismo DPUA da Universidade Federal de Pernambuco, mantido em meio LB-ágar e depois armazenado a 4 ° C.

3.2 Preparo do pré inóculo

O pré-inóculo do *B. thuringiensis* foi produzido utilizando meio padrão (meio LB) em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio LB. Os frascos foram mantidos a 30°C, 200 rpm, por um período de 16 horas (SHOJAADDINI ET AL., 2010).

3.3 Preparo do extrato de palma

Os cladódios da palma (*Opuntia ficus indica* Mill) foram obtidos da Estação Experimental de São Bento do Una - PE, cedidos pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, submetidos a um processo de higienização com hipoclorito de sódio 2% por 20 segundos, em seguida duas lavagens com água destilada. O cladódio foi triturado e o extrato de palma obtido foi diluído na proporção 1:5 (v/v) (NASCIMENTO ET AL., 2015) com líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes (LMMF), centrifugado para retirada dos sólidos suspensos e estocado a -20 °C.

3.4 Obtenção do líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes (LMMF)

Os sobrenadantes dos micro-organismos fotossintetizantes *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Arthrospira platensis* e *Scenedesmus* sp. foram obtidos após seus respectivos cultivos em condições padrões. *C. vulgaris*, *D. tertiolecta* e *Scenedesmus* sp foram cultivadas em frascos Erlenmeyer com 400 mL dos seus respectivos meio de cultura padrão Bold's Basal (BISCHOFF, 1963), meio F/2 (GUILLARD, 1975) e BG-11. Ar filtrado era adicionado para homogeneização e fornecimento de CO₂. *Arthrospira platensis* foi cultivada em frascos de Erlenmeyer com 250 ml de meio padrão (SCHLÖSSER, 1982), em orbital shaker com frequência de agitação de 100 rpm. Todos os cultivos iniciaram com concentração celular de 50 mg.L⁻¹, temperatura de 27 ± 1 °C e intensidade luminosa de 72 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Após 15 dias de cultivo, as células passaram por centrifugação a 8000 rpm, 4°C durante 10 minutos, onde sobrenadante, também chamado de líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes (LMMF), foi obtido. Os LMMF foram esterilizados à 121 °C por 20 minutos, antes de serem utilizados na constituição dos meios de cultura.

3.5 Meios de cultura alternativos

Os meios de cultura tiveram em sua composição extrato de palma diluído em líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes (LMMF) na proporção de 1:5 e uréia a 1 g/L de acordo com a Tabela 1. Todos os meios foram realizados em duplicata com análise a cada 0 à 96 horas.

3.6 Produção de endotoxinas por fermentação submersa

Os meios de cultivo utilizados para a produção foram o meio de cultura alternativo (Tabela 2) em frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL do meio de produção com concentração celular inicial de densidade óptica de 0.15, correspondendo a aproximadamente 2 x 10⁸ UFC/ml e 0,05 g/L de biomassa seca. Os cultivos eram mantidos a 30 °C e 200 rpm em agitador rotativo por um período de 96 horas (Ghribi et al., 2007).

Tabela 2 – Composição dos meios de cultura para produção das endotoxinas de *B. thuringiensis*

Meio de cultura	Líquido metabólico dos micro-organismos fotossintetizantes (LMMF)	Uréia 1 g/L
1	<i>Chlorella vulgaris</i>	Sim
2	<i>Chlorella vulgaris</i>	Não
3	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Sim
4	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Não
5	<i>Arthrospira platensis</i>	Sim
6	<i>Arthrospira platensis</i>	Não
7	<i>Scenedesmus sp.</i>	Sim
8	<i>Scenedesmus sp.</i>	Não
9	Meio de cultura padrão constituído por LB	

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Densidade Ótica (D.O)

Foram realizadas leituras dos melhores tempos da absorbância de 1 mL de solução de cada meio de cultivo no espectrofotômetro a 600 nm. Os brancos foram utilizados para leitura inicial.

3.7.2 Biomassa do cultivo de *B. thuringiensis*

O procedimento da determinação da biomassa seca dos meios de cultura em duplicata foi baseado no método de SHOJAADDINI et al. (2010), onde 2 mL dos meios de cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a 37°C até peso constante.

3.7.3 Contagem das unidades formadoras de esporos (UFC)

Foi colocado 1 mL de cada meio de cultivo em eppendorf e submetido a um banho-maria a 80°C por 15 minutos. Em seguida, foi feita uma diluição seriada da alíquota presente no eppendorf e retirado 100 microlitros de cada diluição para serem colocados em placas de Petri contendo 3 mL de meio LB sólido (1,5 g de ágar para cada 100 mL de meio LB líquido). As placas foram incubadas a 37 °C por 20 horas e

as colônias desenvolvidas pelo *B. thuringiensis* foram contadas e expressas em UFC (Unidade Formadora de Colônias) por mL (SHOJAADDINI et al., 2010).

3.7.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada para avaliar a quantidade de endotoxinas produzidas pelo Bt, ao longo das 96 horas, nos diferentes meios de cultivo utilizados. Para tanto, foram centrifugados 2 mL de cada cultivo a 10.000 rpm por 10 minutos em eppendorf. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de solução salina de cloreto de sódio (1 m/L) e centrifugado novamente em iguais condições. O sobrenadante da segunda centrifugação foi desprezado e o precipitado ressuspensionado novamente em 2 mL da solução salina. Repetindo o mesmo procedimento por mais duas vezes com 2 mL de água destilada estéril. Por último, foram adicionados 2 mL de NaOH (50 mmol/L) nos eppendorf, a fim de solubilizar os cristais de endotoxinas, e incubados à 37°C por 2 horas (SHOJAADDINI et al., 2010).

Em seguida, foi realizada a quantificação das proteínas presentes no sobrenadante através do kit BCA Protein Assay em placas no leitor de ELISA a 595 nm. Os resultados foram expressos em µg/mL em duplicatas.

3.7.5 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

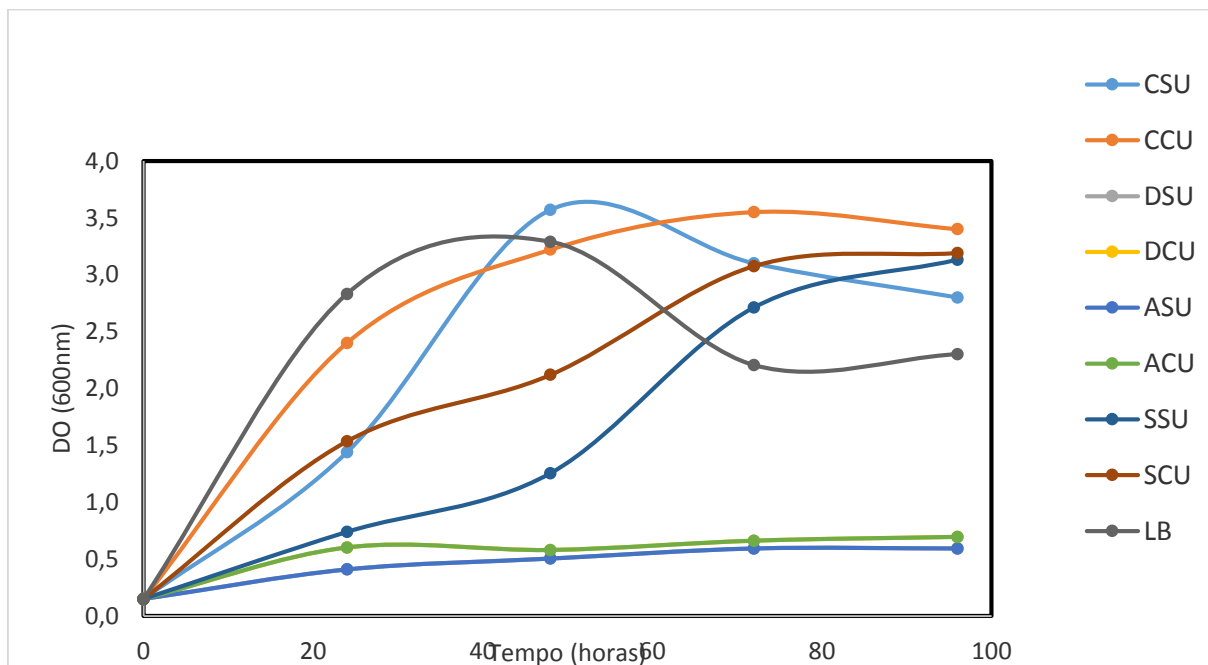
Após o término da realização dos cultivos nos meios de cultura apresentados, foram selecionadas amostras dos melhores meios dos meios de cultura e de palma forrageira com ou sem a presença de ureia, de 24 e 96 horas, para verificação da formação de colônias de esporos e de cristais. A biomassa foi hidratada novamente e uma alicota foi retirada. A leitura foi realizada no microscópio eletrônico de varredura (MEV) do Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de reduzir o custo de produção do biolarvicida produzido por Bt, extrato de palma foi utilizado como fonte de energia o sobrenadante proveniente do cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes *Chlorella vulgaris*, *Arthospira platensis*, *Dunaliella tertiolecta* e *Scenedesmus* sp. foram usados para substituir a solução de sais minerais requerida para a produção da endotoxina no meio de cultura padrão de *B. thuringiensis*

Como podemos observar no Gráfico 1, *Bacillus thuringiensis* cresceu em todos os meios alternativos avaliados, mas com variações de crescimento entre eles. Exceto para os cultivos com sobrenadante de *A. platensis*, não foi observado fase lag no crescimento celular, mostrando que as células se adaptaram rapidamente aos meios alternativos. As fases de crescimento de *Bacillus thuringiensis* são semelhantes as fases de crescimento de outras bactérias, constituindo de fase lag, log e estacionária (PINTO ET AL. 2010).

Gráfico 1 - Crescimento celular do *Bacillus thuringiensis* 370 determinado por absorvância em função do tempo em diferentes meios de cultura expressa de 0 a 96 horas



LB: Meio Luria-Bertani padrão; ACU: líquido metabólico de *Arthospira platensis* com ureia; ASU: líquido metabólico de *Arthospira platensis* com ureia; SCU: líquido metabólico de *Scenedesmus* sp. com ureia; SSU: líquido metabólico de *Scenesmus* sp. sem ureia); CCU: líquido metabólico de *Chlorella vulgaris* com ureia); CSU: líquido

metabólico de *Chlorella vulgaris* sem ureia; DCU: líquido metabólico de *Dunaliella tertiolecta* com ureia) e DSU líquido metabólico de *Dunaliella tertiolecta* sem ureia.

Na fase log há um crescimento exponencial celular, ou seja há uma oferta de nutrientes sendo fornecidos que são compatíveis com as necessidades nutricionais da bactéria. Já na fase estacionária, as necessidades nutricionais não são mais correspondidas pela queda nos nutrientes. Podemos observar que o crescimento do Bt nos meios tem o seu crescimento celular típico, onde há o declínio do crescimento após os picos que demandaram elevado consumo de nutrientes.

No geral, o cultivo com o meio padrão LB obteve maior DO no tempo mais curto (24 horas) quando comparado o crescimento nos meios alternativos, os quais obtiveram maiores valores de DO após 48 horas de cultivo. Geralmente na escala laboratorial, os meios de cultura padrões são constituído por componentes de alto custo, mas devido as altas taxas de crescimento e reprodutibilidade dos resultados são amplamente utilizados nas pesquisas científicas. O extrato de levedura é um dos compostos utilizados no meio padrão, composto por material protéico (73-75%), aminoácidos livres e oligopeptídeos de diferentes massas moleculares, além de vitaminas, sais minerais e polissacarídeos, constituindo uma fonte nutricional muito utilizada para o cultivo de Bt em escala de laboratório (VALLEJO ET AL., 1999; KHUZHAMSHUKUROV et al., 2001; ANDERSON E JAYARAMAN, 2003).

Como podemos observar no Gráfico 1, os maiores valores de densidade óptica foram obtidos nos cultivos com o meio constituído por sobrenadante de *C. vulgaris* com e sem ureia, obtendo valores próximos aos cultivos utilizando meio padrão LB com valores máximos entre 3,0 e 3,5, no tempo de 48 h. Os cultivos com sobrenadante de *Scenedesmus* sp. acrescido com ureia também obteve crescimento celular satisfatório, com valores de densidade ótica de 2,5 após 72 horas. İçgen et al (2002) relataram o crescimento de Bt em diferentes meios de cultura e observaram que o Bt cresce até 6 h de cultivo, após este período, o crescimento atinge a fase estacionária. O mesmo foi observado por Pootathi e Kumar (2003), só que o crescimento celular foi até 18 horas. Essas diferenças podem ser correlacionadas com o isolado de Bt, meio de cultura e condições de cultivo utilizados. No entanto foi possível observar crescimento após esses tempos citados nos cultivos alternativos usados.

Os cultivos com sobrenadante de *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta* não obtiveram o mesmo desempenho para o crescimento Bt que os sobrenadantes anteriores, independente da presença da ureia. O sobrenadante da *A. platensis*

apresenta pH elevado, acima de 8.0, por ser pH ideal para o crescimento da *A. platensis*. No entanto, esse pH elevado pode ter prejudicado o crescimento do Bt, uma vez que seu pH ideal é em torno de 6.0. Os cultivos com sobrenadante de *D. tertiolecta* prejudicaram o crescimento do Bt, provavelmente porque o sobrenadante de *D. tertiolecta* apresenta uma salinidade bem maior que dos outros microrganismos fotossintetizantes, uma vez que é constituído por água do mar e sais minerais. Essa alta salinidade pode ter prejudicado o crescimento do *B. thuringiensis*. Ghribi et al., (2005) relata que NaCl a 7 - 8 g/L aumenta a produção de delta-endotoxina pelo aumento de UFC. No entanto, para atingir uma concentração média 7,5 g/L, a água do mar precisa ser diluída 4 vezes. Isso está de acordo com o presente trabalho onde utilizou o sobrenadante do cultivo de *D. tertiolecta*, o qual é constituído basicamente pela água do mar, acarretando, por sua vez, redução do crescimento do *B. thuringiensis* Bt370. Ghribi et al (2007) substituiu a solução mineral do meio de cultura do *B. thuringiensis* pela água do mar e obteve um aumento na concentração de biomassa e na UFC. Uma alternativa seria essa diluição para obtenção de outros resultados.

Os meios alternativos constituídos por sobrenadante dos cultivos de *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp, extrato de palma e adição de ureia ou não proporcionaram maiores valores de crescimento celular.

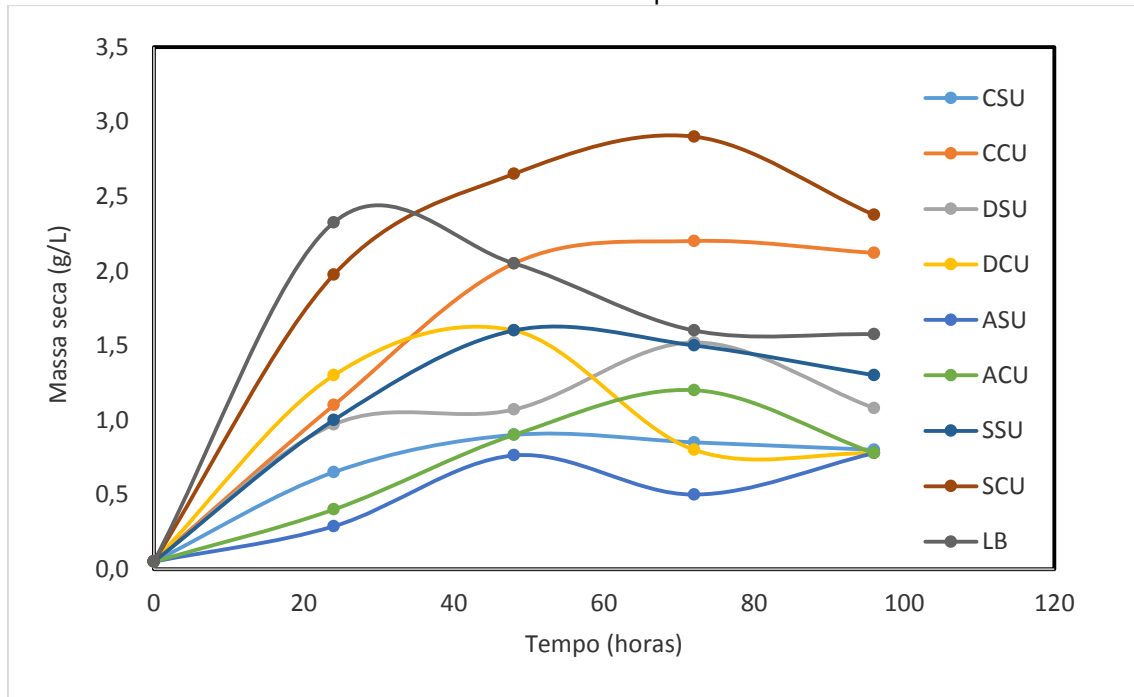
Quando observamos os micronutrientes, íons metálicos como Ca^{+2} , Mn^{+2} e Mg^{+2} são também importantes para Bt (Yang e Wang, 1998). Segundo Yao et al. (2002, 2003), íons Mn^{+2} e Cu^{+2} podem estimular ou inibir o crescimento dependendo das concentrações utilizadas. Podemos observar que *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp tem em seus meios de crescimento a presença destes íons em quantidades maiores que nos meios de *A. platensis* e *D. tertiolecta*, o que pode ter influenciado no crescimento da bactéria.

O crescimento celular do Bt370 em diferentes meios de cultura também foram determinados por massa seca. Os maiores valores de massa seca foram após 48 horas de cultivo para a maioria dos meios utilizados. Podemos observar no Gráfico 2 que o sobrenadante do cultivo de *Scenedesmus* sp é o meio que tem o crescimento mais estável e próximo quando em comparação com o meio padrão. No tempo de 48 horas, podemos verificar que o crescimento de *Scenedesmus* sp é maior que LB.

Prabakaran e Balaraman (2006) relataram que as toxinas de Bt tem produção máxima após 24 horas de cultivo em meio de caldo nutriente e no meio de soja. No período de 24 a 42 h não aumentou a toxicidade. Portanto, o produto obtido no final

da fase estacionária poderá permitir uma recuperação máxima da endotoxina e esporos.

Gráfico 2 - Crescimento celular do Bt370 determinado em massa seca em função do tempo em diferentes meios de cultura expressa de 0 à 96 horas



LB: Meio Luria-Bertani padrão; ACU: líquido metabólico de *Arthospira platensis* com ureia; ASU: líquido metabólico de *Arthospira platensis* sem ureia; SCU: líquido metabólico de *Scenedesmus* sp. com ureia; SSU: líquido metabólico de *Scenedesmus* sp. sem ureia; CCU: líquido metabólico de *Chlorella vulgaris* com ureia; CSU: líquido metabólico de *Chlorella vulgaris* sem ureia; DCU: líquido metabólico de *Dunaliella tertiolecta* com ureia) e DSU líquido metabólico de *Dunaliella tertiolecta* sem ureia.

A partir de uma análise macroscópica dos cultivos em seus respectivos meios de culturas, observou-se que o cultivo com meio de cultura constituído por extrato de palma, sobrenadante de *Chlorella vulgaris* ou *Scenedesmus* sp. e ureia apresentaram uma maior formação de grumos quando comparado com outros meios de cultura, sendo portanto considerados mais apropriados como meio de cultura alternativo para a o crescimento do BT370.

Há um tempo necessário para a formação de grumos, ocorrendo ao final do crescimento vegetativo e início da fase de transição para esporulação. O tempo de formação desses grumos (floculação) coincide com a diminuição da motilidade celular, onde há uma diminuição da velocidade de crescimento. Pesquisadores tem demonstrado que as condições nutricionais e operacionais podem afetar a formação

de grumos (BERBERT-MOLINA et al., 2008). Portanto podemos observar nas Figuras 4 a 7 que os meios compostos por *Chlorella vulgaris*, com palma e ureia e *Scenedesmus* sp, palma e ureia apresentam uma turbidez e coloração semelhantes ao meio padrão, tendo apresentado formação de grumos, diferentemente dos outros meios.

Figura 4 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura padrão LB, após 96 h



Figura 5 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Chlorella vulgaris* e ureia, após 96 h.

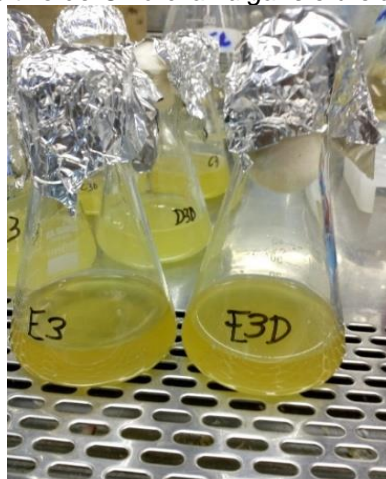


Figura 6 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Dunaliella tertiolecta* e ureia, após 96 h.

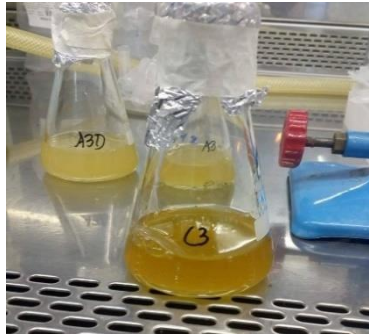
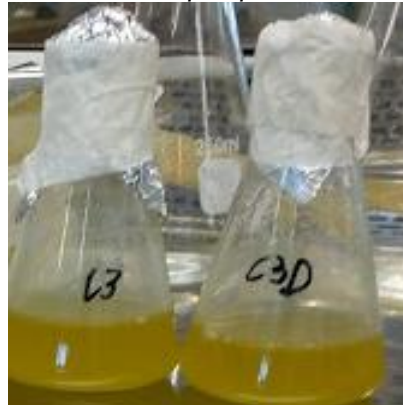


Figura 7 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Arthrospira platensis* e ureia, após 96.



4.1 QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS E ENDOTOXINAS

Os valores de quantidade de esporos e endotoxinas estão expressos nas Tabelas 3 – 6.

Tabela 3 – Quantificação das formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas nos cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de *C. vulgaris*, extrato de palma com e sem uréia em comparação com o LB.

TEMPO	UFC/ml			Endotoxina mg/L		
	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>C. vulgaris</i>	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>C. vulgaris</i> + Uréia	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>C. vulgaris</i>	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>C. vulgaris</i> + Uréia
0	16 x 10 ⁴	16x10 ⁴	10 ⁴	0,00	0,00	0,00
24	63 x 10 ⁴	86 x 10 ⁶	82 x 10 ⁶	0,37±0,01	0,10±0,00	0,15±0,00
48	17 x 10 ⁶	81 x 10 ⁶	113 x 10 ⁶	0,31±0,00	0,08±0,00	0,18±0,00
72	16 x 10 ⁸	128 x 10 ⁶	390 x 10 ⁶	0,27±0,00	0,78±0,00	0,16±0,00
96	275 x 10 ⁶	> 380 x 10 ⁸	> 327 x 10 ⁸	0,32±0,07	0,75±0,02	0,14±0,02

Tabela 4 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas nos cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de *Scenedesmus* sp., extrato de palma com e sem uréia em comparação com o LB.

TEMPO	UFC/ml			Endotoxina mg/L		
	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante de <i>Scenedesmus</i> sp	Extrato de Palma + Sobrenadante de <i>Scenedesmus</i> sp + Uréia	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante de <i>Scenedesmus</i> sp	Extrato de Palma + Sobrenadante de <i>Scenedesmus</i> sp + Uréia
0	16 x10 ⁴	16 x10 ⁴	16 x10 ⁴	0,00	0,00	0,00
14	63 x 10 ⁴	100 x 10 ²	150 x 10 ²	0,27±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01
38	17 x 10 ⁶	150 x 10 ⁶	245x 10 ⁴	0,31±0,00	0,17±0,01	0,31±0,01
62	16 x 10 ⁸	250 x 10 ⁴	>350 x 10 ⁴	0,37±0,00	0,16±0,01	0,32±0,01
86	275 x10 ⁶	>300 x10 ⁴	>400 x10 ⁴	0,32±0,07	0,19 ±0,01	0,31±0,01

Estudos relatam que a formação das toxinas paraesporal em BT geralmente ocorrem de duas a três horas após a fase exponencial de crescimento e durante a esporulação (Manonmani e Balaraman, 2001). A produção de esporos foi maior nos cultivos utilizando meio de cultura constituído por extrato de palma e sobrenadante do cultivo de *Chlorella vulgaris* com ou sem uréia (Tabela 3), e sobrenadante de *Scenedesmus* sp. (Tabela 4) com valores maiores que 380 x 10⁸ UFC/ml, impossibilitando a contagem exata de números de colônias devido à grande quantidade destas. Assim, esses experimentos precisarão ser repetidos para avaliar a contagem de esporos em uma diluição maior que 10⁸ UFC/ml.

A esporulação é uma forma da bactéria contornar situações adversas, visto que os esporos produzidos como sinal de resistência. De forma mais ampla, a esporulação inicia na fase estacionária, quando a bactéria consumiu grande parte das fontes de nutrientes e esse fator sinaliza a necessidade de proteção. Além disso, durante a fermentação, o microrganismo, pode produzir metabólitos que, com o acúmulo, acaba por inibir seu próprio crescimento (CARVALHAL & ALTERTHUM, 1999).

Öskan et al. (2003) e İçgen et al (2002a) revelaram que o manganês é um íon essencial para a diferenciação celular, sendo requerido para esporulação e formação do cristal. No entanto, concentrações muito elevadas de manganês tornam-se tóxicos para os processos celulares. Podemos observar que os meios de *Scenedesmus* sp e *C. vulgaris* contém esses íons na composição dos seus meios em valores aproximados.

O cálcio é importante para o processo de esporulação e estabilidade do cristal proteico, e tem sua importância limitada para o crescimento vegetativo e síntese protética. Diante dessas perspectivas o cálcio não é essencial para a síntese das

proteínas Cry. Desta forma, diversos estudos recomendam o uso de concentrações menores de cálcio, a fim de não comprometer a formação das proteínas Cry (IÇGEN et al, 2002). Os meios de crescimento de *Scenedesmus* sp. e *C. vulgaris* tem pequenas quantidades de cálcio, o que pode ter levado ao aumento da esporulação sem prejuízo a produção de proteínas.

Os cultivos utilizando o sobrenadante de *A. platensis* (Tabelas 5) e *D. tertiolecta* (Tabelas 6) obtiveram contagem de esporos máximas na ordem de 10^4 e 10^6 , respectivamente, valores menores quando comparados os cultivos utilizando sobrenadante de *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp., meio mineral e LB.

Tabela 5 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas nos cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de *A. platensis*, extrato de palma com e sem uréia em comparação com o LB.

TEMPO	UFC/ml			Endotoxina mg/L		
	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>A. platensis</i>	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>A. platensis</i> + Uréia	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>A. platensis</i>	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>A. platensis</i> + Uréia
0	16×10^4	16×10^4	16×10^4	0,00	0,00	0,00
14	63×10^4	26×10^2	35×10^2	0,37±0,01	0,13±0,00	0,8±0,00
38	17×10^6	24×10^6	20×10^4	0,31±0,00	0,13±0,00	0,4±0,00
62	16×10^8	35×10^4	27×10^4	0,27±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00
86	275×10^6	30×10^4	60×10^4	0,32±0,07	0,08±0,02	0,010±0,02

Tabela 6 – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e endotoxina obtidas nos cultivos utilizando meios de cultura constituído por sobrenadante de *D. tertiolecta*, extrato de palma com e sem uréia em comparação com o LB.

TEMPO	UFC/ml			Endotoxina mg/L		
	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>Dunaliella tertiolecta</i> + Uréia	LB PADRÃO	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Extrato de Palma + Sobrenadante da <i>Dunaliella tertiolecta</i> + Uréia
0	16×10^4	16×10^4	10^4	0,00	0,00	0,00
14	63×10^4	23×10^6	20×10^6	0,37±0,01	0,005±0,00	0,05±0,00
38	17×10^6	19×10^6	70×10^6	0,31±0,00	0,006±0,00	0,02±0,00
62	16×10^8	87×10^6	79×10^6	0,27±0,00	0,05±0,00	0,10±0,00
86	275×10^6	32×10^6	85×10^6	0,32±0,07	0,03±0,05	0,14±0,03

A síntese de proteínas ocorre durante a esporulação, portanto, diferente de muitos cultivos, a fase estacionária precisa ser considerada para as produções das devidas funções no cultivo dessa bactéria (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000). Por isso

é importante destacar os meios que obtiveram a faixa de esporulação crescente e equivalente ao meio padrão em conjuntura com o padrão das fases estacionárias dos meios. Sendo de suma relevância já que esse parâmetro avalia uma taxa de toxicidade maior e mais eficaz.

Nas Figuras 8 a 11 estão as fotos das endotoxinas com formato bipiramidal produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* BT370 cultivadas nos diferentes meios de cultura. A maior quantidade de cristais foi observada no meio de cultura constituído por sobrenadante de *C. vulgaris* e ureia (Figura 9). Isto está de acordo com os resultados de contagem de UFC e dosagem de endotoxinas (Tabela 3), o qual apresentou maior valor quando comparado aos outros cultivos. Prabakaran e Balaraman, (2006) que relataram que as proteínas endotoxinas acumuladas como cristal paraesporal são produzidas na fase de esporulação de crescimento. Por isso esse parâmetro fornece a mensuração da capacidade de produção das cepas e meios.

Figura 8 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura padrão LB, após 96 h

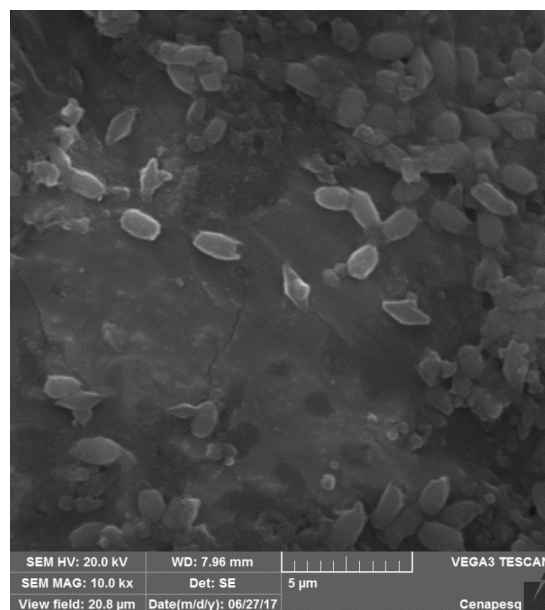


Figura 9 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Chlorella vulgaris* e ureia, após 96 h.

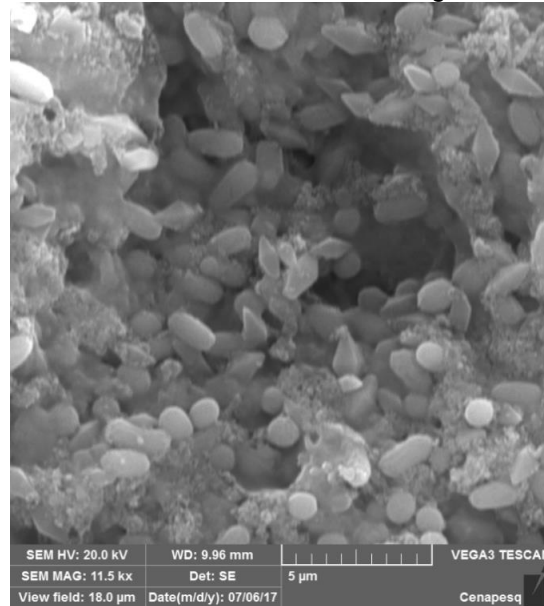


Figura 10 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Dunaliella tertiolecta* e ureia, após 86 h.

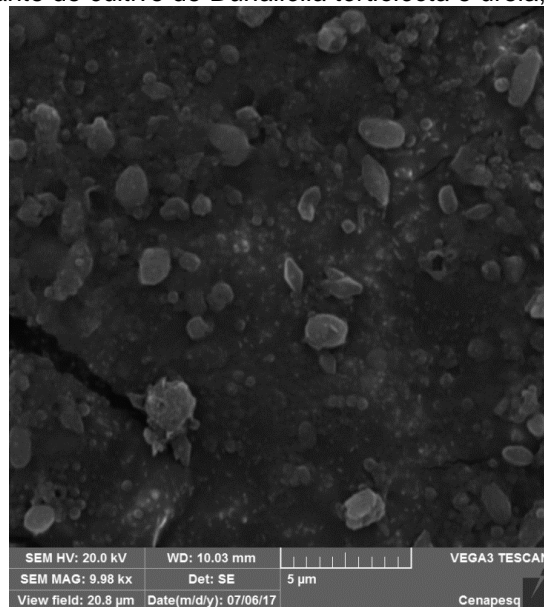
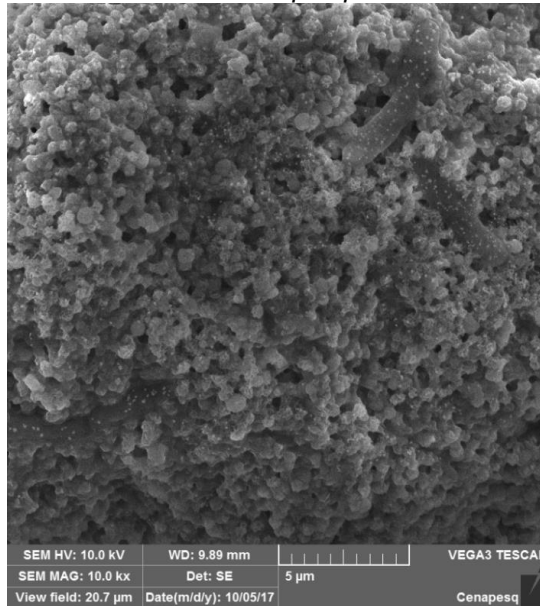


Figura 11 - *Bacillus thuringiensis* Bt370 em meio de cultura constituído de extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Arthrospira platensis* e ureia, após 86 h.



A atividade larvicida das preparações a base de *Bacillus thuringiensis* disponíveis no mercado são baseadas em proteínas endotoxinas acumuladas como cristal paraesporal produzido por essas bactérias durante a fase de esporulação de crescimento (PRABAKARAN E BALARAMAN, 2006). Sabe-se que a produção da endotoxina está relacionada com a produção de esporos (ZOUARI AND JAOUA, 1999) e a produção de protease é importante para determinar a estabilidade da toxina (GHRIBI ET AL., 2007).

Diferentes meios de cultura constituídos por produtos agrícolas têm sido avaliados para a produção das endotoxinas de Bt. Prabakaran e Balaraman (2006) relataram que meio com soja e minerais obtiveram maior toxicidade após 24 h de cultivo, com resultados semelhantes aos obtidos com meio padrão caldo nutriente. No Brasil, a soja tem sido relatada como meio de referência para produção em larga escala de Bt com atividade larvicida. Entretanto, podemos observar que os meios alternativos compostos por *Chlorella vulgaris*, extrato de palma e ureia também apresentam essa capacidade na produção de endotoxinas.

5 CONCLUSÃO

O extrato de palma pode ser uma alternativa para a redução do custo do meio de cultura. Este substrato possui outras vantagens como disponibilidade o ano todo, permite uma rápida esporulação, alta produção de biomassa, curto tempo de fermentação e fácil preparo e estocagem. O uso do líquido metabólico de organismos fotossintetizantes permite a reciclagem de resíduos que seriam descartados e que tem grande potencial de nutrientes utilizados em suas formulações e produzidos durante o crescimento dos organismos. Nesse contexto, o uso do extrato de palma, sobrenadante do cultivo de *Chlorella vulgaris* com e sem ureia e de *Scenedemus* sp são uma alternativa para redução do custo do meio de cultura, principalmente na Região do nordeste brasileiro que tem altas produções desse substrato que fornece as características nutricionais satisfatórias.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, A. A stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of microbiology e Biotechnology*, Oxford, v. 17, n. 9, p. 857-861, 2001.
- ABIMILHO. 2017. O Cereal que enriquece a alimentação humana. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>
- ADAMS, T. T.; EITENAN, M. A.; HANEL, B. M. Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresource Technology*, New York, v. 82, n. 1, p. 33-41, 2002
- Alguacil J, Kauppinen T, Porta M, Partanen T, 2000. Risk of pancreatic cancer and occupational exposures in Spain. *Ann Occup Hyg*, 44: 391–403
- ALVES, Hellen Cristina Rodrigues; AMARAL, Renata Firmino do. Produção, área colhida e produtividade do milho no Nordeste. Informe Rural ETENE, ano V, nº 16, set. 2011. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/88765/89729/ire_ano5_n16.pdf/bea61fe8-4c6d-4f02-ade4-21dcfd901fdf
- A.M. Manonmani, K. Balaraman A high mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* var. thompsoni *Curr. Sci.* 80 (2001), p. 779 CARVALHAL, M. L.; ALTERTHUM F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L. R. et al. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.9-24.
- ANDERSON, R.K.I.; JAYARAMAN, K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v.17, n.3, p.225- 231, 2003.
- ÂNGELO, E. A.; VILAS_BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. ***Bacillus thuringiensis: características gerais e fermentação***. Londrina: Semina: Ciências Agrárias, v.31, n.4, p.945-958, out./dez. 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010. Brasília: ANVISA, 2011. Acesso em: 01 de julho de 2018.
- Aoki K, Chegâsaki Y. Âoeber die pathogenität der sog. Sotto Bacillen (Ishiwata) bei seidenrauen. *Mitt Med Fak Kais.* 1915; 13:419. (Ita).
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILASBÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: Agropecuária, 2002. p. 269-293.

ARCAS, J.; YANTORO, O.; ERTOLA, R. A new medium for growth delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. *Biotechnology Letters*, London, v. 6, n. 8, p. 495-500, 1984

Aronson, A. I.; Beckman, W.; Dunn, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**. v. 50, p. 1-24. 1986

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE SOJA E MILHO DE MATO GROSSO (AprosojaMT). A história do Milho. 2016. Disponível em: Acesso em: 20 out. 2016.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, 2000.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.

BAUER, L. S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Fl. Entom.**, v. 78, n. 3, p. 414-443, 1995.

BECHTEL, D.B., BULLA, L.A. Jr. Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*. v 127, p. 1472 – 1481, 1976

BENNETZEN, J.; BUCKLER, E.; CHANDLER, V.; DOEBLEY, J.; DORWEILER, J. Genetic evidence and the origin of maize. *Latin American Antiquity*, 12:84-86, 2001.

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

BERLINER, E. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift fur angewandte Entomologie**, n.2, p.29-56, 1915.

BIANCO, R. Pragas e seu controle. In. FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, **A cultura do milho no Paraná**. Londrina, 1991. p.185-221. (IAPAR. Circular, 29).

Bischoff, H. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. Austin Tex: University of Texas, 1963.

BIZARRI, M. F.; BISHOP, A. H.; DINSDALE; A.; LOGAN, N. A. Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 104, n. 1, p. 60-69, 2008 *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4 (2015) 737–744.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34. p.843-850, 2003.

BORGES, I. D. **Marcha de absorção de nutrientes e acúmulo de matéria em cultivares de milho**. Minas Gerais: UFLA, Tese (Doutorado em Fitotecnia), 115 p. 2006.

BRANCO, A. L. O. C. A produção de soja no Brasil: uma análise econométrica no período de 1994-2008.

Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Zhuang M, Gill SS, Soberón M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochem Biophys Acta*. 2004;1667:38–46.

Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011;41:423–431

Bravo A, Gill SS, Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49:423–435

Bravo A, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV; 2005. pp. 175–206. ISBN 0-44-451516-X.

Bravo A, Soberón M. How to cope with resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol*. 2008;26:573–579

Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villa-lobos, F. J.; Guadalupe, P. Nunez-Valdez, M. E.; Soberón, M.; Quintero, R. Characterization of cry genes in mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**. v. 64, p. 4965-4972. 1998.

BRAVO, A. et al. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 277, p. 23985-23987, 2002.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

BURANELLO, R.M.; Sistema privado de financiamento do agronegócio. São Paulo: Editora Quartier Latin do Brasil, 2009, 471p.

BUENO, A.F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BUENO, R.C.O. Controle de pragas apenas com o MIP. *A Granja*, p. 76 - 78, jan/2010.

CAMPANINI, E.B.; DAVOLOS, C.C; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilhabela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Brazilian Journal of Biology*, v.72, p.1-5, 2012

Candas, M., and L. A. Bulla. 2002. Insecticides, Microbial. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons, NY, p. 1709-1717.

CARVALHO, A. O. R. Pragas e seu controle. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRÔNOMICO DO PARANÁ, **O milho no Paraná**. Londrina, 1982. p.141-148. (IAPAR. Circular, 68).

CARVALHO, N.L.; BARCELLOS, A.L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET/UFMS* v(5), nº5, p. 749 - 766, 2012.

CEPEA. PIB agronegócio. 2013. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/categoria/custos-e-producao-milho.aspx>.

Chakroun, M.; Bel, Y.; Caccia S.; Abdelkefi Mesrati, L.; Escriche, B.; Ferré, J. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.110, p.334-339, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.03.021.

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. In vivo and in vitro binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by 125I radiolabeling. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, p.6258-6265, 2014. DOI: 10.1128/AEM.01521-14

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

CHEN, S; HONG, E. J.-Y.; WU, E. W.-T. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Basingstoke, v. 30, n. 12, p. 677-681, 2003

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2016/17. Quarto Levantamento. Brasília: Conab, v. 4, n.4, 2017. 162p. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira: 2015/2016. Brasília, DF. 2016. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>

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

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

CRIALESI-LEGORI, P.C.B. et al. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 49: 79-87, 2014

CRICKMORE N., ZEIGLER D. R., E. SCHNEPF, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUM, A. BRAVO, AND D. H. DEAN. 2005. *Bacillus thuringiensis* toxin Nomenclature. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.2018

CRUZ, I. (Ed.). **Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico**. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**; Sete Lagoas: *Embrapa Milho e Sorgo*, 192p. 2008

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1995, 45p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 21).

CRUZ, I. FIGUEIREDO, M. L. C.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. International Journal of Pest Management, London, v. 45, n. 4, p. 293-296, 1999.

CRUZ, I. **Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico**. Brasília: EMBRAPA. v. 1, p. 192, 2008.

CRUZ, I.; VIANA. P. A.; WAQUIL, J. M. Cultivo do milho: Pragas da fase vegetativa e reprodutiva. Sete lagoas: Embrapa, CNPMS (Comunicado técnico, n. 49). 2002. 8p.

De MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics, Amsterdam, v.17, n.40, p.193-199, 2001.

DEVI, P. S. V.; RAVINDER, T.; JAIDEV, C. Barleybased medium for the cost-effective production of *Bacillus thuringiensis*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Oxford, v. 21, n. 2, p. 173-179, 2005

DIAS PAES, M. C. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Circular Técnica, Sete Lagos, 2006.

ENNOURI K, AYED RB, HASSEN HB, MAZZARELLO M, OTTAVIANI E. 2015. Experimental design and bayesian networks for enhancement of delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. p. 379-392.

ERNANDES, S. Obtenção de bioinseticida a partir de *Bacillus thuringiensis var.israelensis* e aplicação de bioensaios em culicídeos. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

ESTADOS UNIDOS. Brazil's corn imports surge as domestic prices rise. Washington, DC, 2016.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULIS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389

-5394, 1996.

ESTRUCH, J.J., CAROZZI, N.B., DESAI, N., NICHOLAS, B., DUCK, N.B., WARREN, G.W. & KOZIEL, M.G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nature Biotechnology 15:137–141. 1997.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, 360 p. 2000

FERREIRA, J. B. de S. F; ALVES, L. R. A.; GOTTARDO, L. C. B.; GEORGINO, M. Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil. Piracicaba: Sociedade brasileira de economia administração e sociologia rural, 2010.

FIUZA, L.M., et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidea): evidence of shared binding sites. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.62, n.5, p.1544-1549, 1996.

FIGUEIREDO, M. L. C.; PENTEADO-DIAS, A. M.; CRUZ, I. Danos provocados por *Spodoptera frugiperda* na produção de matéria seca e nos rendimentos de grãos, na cultura do milho. Sete lagoas: Embrapa, CNPMS. 2005. 6p. (Comunicado técnico, n. 130).

FIGUEIREDO, Maria de Lourdes Côrrea et al. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v.41, n.12, p.1693-1698, dez. 2006.

GALLO, Domingos et al.; Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p. Volume 10.

GHRIBI, D.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 98, n. 4, p. 823-831, 2005.

GHRIBI D, Zouari N, Trigui W, Jaoua S (2007) Use of sea water as salts source in starch and soya bean based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. Process Biochem 42:374-378.

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

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. 1998. Report for the Ministry of Health, Grasslands, New Zealand. Division, AgResearch, Lincoln.

GLAT, D. Presente e futuro da cultura de milho no mundo. Informativo Pioneer, Santa Cruz do Sul, RS, ano XV, n. 31, 2010. Disponível em: http://www.agrolink.com.br/vacinas/artigo/a-evolucao-da-productividade-do-milho-nobrasil_130498.html

GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v. 79, n. 22, p. 6951-6955, 1982.

GRAVENA, S.; PAIVA, P.E.B.; SILVA, J.L.; BENVENGA, S.R.; GRAVENA, R.; ARAUJO JUNIOR, N. Ácaros dos citros. 2.ed. Jaboticabal: Gravena, 1999. 17p.

Guillard, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W. L. Smith; M. H. Chanley (Eds.); Culture of marine invertebrate animals: Proceedings --- 1st Conference on culture of marine invertebrate animals greenport. p.29-60, 1975.

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

Hannay CL (1953) Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature (Lond), 172: 1004.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000
Isman, M., 2002. Insect Antifeedants. Pesticide Outlook 13, 152-153.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.-F. et al. (Eds). Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-64.

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

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

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

IVAN, I.A.F.; SILVA, K.R.; LOBOSCHI, D.L.; ARAUJO JR, L.P.; SANTOS, A.J.P.S.; PINTO, A.S. Número de liberações de *Telemonus remus* no controle de ovos de *Spodoptera frugiperda* em milho de segunda safra. *Entomologia*, XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 284-288, 2016.

Ji BT, Silverman DT, Stewart PA. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am J Ind Med*, 2001; 39: 92–9.

KHUZHAMSHUKUROV, N.A.; YUSUPOV, T.Y.; KHALILOV I.M.; GUZALOVA A.G.; MURADOV, M.M.; DAVRANOV, K.D. The insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.37, n.6, p.596- 598, 2001.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal dendotoxins. **Advances in Insect Physiology**. v.24, n.2, p.275-308, 1994.

JOUNG, K. B.; COTÉ, J. C. A Review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Saint-Jean-sur-Richelieu: Horticultural Research and Development Centre, 2000 (Technical Bulletin n. 29).

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Lecadet, M. M.; Frachon, E.; Dumanoir, V. C.; Ripouteau, H.; Hamon, S.; Laurent, P.; Thiéry, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*. v. 86, p. 660-672. 1999

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F., CORY, J.S., BAILEY, M. J., HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**, Chichester: J. Wiley e Sons, p.37-70, 1993.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, A. A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. New York: Wiley, 1993. p. 37-70.

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

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. C rystal structure of insecticide deltaendotoxina from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v.353 n.7,p.815-821,1991.

LIU, T.; GUO, W.; SUN, W.; SUN, Y. Biological characteristics of *Bacillus thuringiensis* strain Bt11 and identification of its cry type genes. *Frontiers of Agriculture in China*, v.3, p.159 163, 2009.

LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CANEIRO A. A. Milho Bt: Alternativa tecnológica no controle de insetos-pragas. *Biociência* v. 12, n. 1, p. 10-15, 2002.

LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). *Entomopathogenic*

bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 167-180.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023*. Brasília, 2013.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Porto Alegre, n. 34, p. 67-77, 2005.

METCALF RL, LUCKMAN WH. 1994 Introduction to insect pest management. 3ª Edição.

MELO, E. P. de; JUNIOR, I. S. L; BERTONCELLO, T. F; SUEKANE, R.; DEGRANDE, P. E.; FERNANDES, M. G. Desempenho de armadilhas a base de feromônio sexual para o monitoramento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. *Entomotrópica*, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de. Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 264 p, 1998.

MENDES, S. M. et al. Respostas da lagarta do cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry1A(b). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011.

Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

MONTEIRO, M. A. R.; CRUZ, J.C.; OLIVEIRA, A. C. de; RAMALHO, M.A.P.; VON PINHO, R.G. Desempenho de cultivares de milho para produção de grãos no Estado de Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v.24, n.4, p. 881-888, out/dez.,2000.

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

MORAES, I. O.; CAPALBO D. M. F. & ARRUDA, R. O. M. Produção de bactérias entomopatogênicas, in ALVES, S. B (Ed.) Controle microbiano de insetos, Piracicaba, FEALQ/USP , 1998. 1163p.

MORAES, R.F.O.; TOSCANO, L.C.; PEREIRA, M.F.A.; PIETROBOM, V.L.;BARBOZA, C.A.M.S.; MARUYAMA, W.I. *Beauveria bassiana* em associação com milho geneticamente modificado no manejo de *Spodoptera frugiperda* e *Rhopalosiphum maidis*. *Arquivos do Instituto de Biologia*, São Paulo, v.82, 1-7, 2015.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U. A. et al. (eds.). *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001 v. 3, p. 249-78.

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

Moragas, W.M., Schneider, M.O., 2003. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. Caminhos de Geografia 3, 26-40

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

MOSCARDI, F. **Utilização do Baculovírus anticarsia o controle de Anticarsia gemmatalis.** EMBRAPA/CNPSo. 13p . *Comunicado Técnico*, 23, Londrina, 1983.

Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., Rogers, K.R., 2001. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. Biosens. Bioelectr. 16, 225/230.

Nascimento, T.C.E.S.; Sena, A.R.; Gomes, J.E.G.; Santos W.L.; Montalvo, G.S.A.; Tambourgi, E.B.; Medeiros, E.V.; Sette, L.D.; Pessoa Junior, A.; Moreira, K.A. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Over production using cactus pear extract with response surface methodology.

NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Importância das coleções de milho e perspectivas de coleta. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 633-661, 2005.

Negrisol Jr., A.S., Garcia, M.S., Negrisol, C.R.C.B., 2010. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. Crop Protection in press, 1–5

NERI, D. K. P. et al. A interação silício com inseticida regulador de crescimento no manejo da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Ciência e Agrotecnologia. V.29, n.6, p. 1167-1174, 2005.

NOJOSA, G. B. A. et al. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. Piracicaba: FEALQ, 2006, p. 139- 153

NONINO, M. C.; PASINI, A.; VENTURA, M. U. Atração do predador *Doru luteipes* (Scudder) (*Dermoptera: Forficulidae*) por estímulos olfativos de dietas alternativas em laboratório. *Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 623-627, 2007.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; ZACCHEO, P.V.C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia, Guarapuava, v. 4, n. 2, p. 226–244, 2011.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; FARIAS, J.R. Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas *Bt*. ESALQ/USP, 2013.

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

PATERNIANI, E, Métodos tradicionais de melhoramento do milho. In: BULL, L.T; CANTARELLA, H., *Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade*, Piracicaba, POTAFOS, cap.3, p. 23-43, 1993

PEIXOTO, Claudio de Miranda. O milho no Brasil, sua importância e evolução. *Seed News: A revista internacional de sementes*. Fev/2014.

PERINI, F. O. Avaliação da multiplicação da *Bacillus thuringiensis* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

PESSANHA, L. G. Otimização da composição do meio de cultivo na fermentação de caldo de cana-de açúcar por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Campo dos Goytacazes: Tese (Mestrado em Biociência e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.

PINTO L. M. N.; BERLITZ D.L.; CASTILHOS-FORTES R.; FIUZA L.M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* – n. 38, 2010

Pinto LMN, Berlitz DL, Castilhos-Fortes R and Fiuza LM (2009/2010) Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 38: 24-31.

PICANÇO, M. C. Manejo Integrado de Pragas. UFV. Viçosa: 2010. Disponível em: <<http://www.ica.ufmg.br>.

POMARI, A.F.; BUENO, A.F.; BUENO, R.C.O.F.; MENEZES JUNIOR, A. de O.; FONSECA, A.C.P.F. Releasing number of *Telenomus remus* (Nixon) (*Hymenoptera: Platygasteridae*) against *Spodoptera frugiperda* Smith (*Lepidoptera: Noctuidae*) in corn, cotton and soybean. *Ciência Rural*, v.43, p.377-382, 2013.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociência*, Texcoco, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2003.

Poolpak, T., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Arjarasirikoon, U., Thanwaniwat N., 2008. Residue analysis of organochlorine pesticides in the Mae Klong river of Central Thailand. *Journal of Hazardous Materials* 156, 230–239.

Prabakaran G., Balaraman K. 2006. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biol. Control* 36: 288–292.

POOPATHI S, KUMAR KA. 2003. Novel Fermentation Media for Production of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Journal of Economic Entomology. p 1039-1044.

Praça L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B.; Dias, D.G.S.; Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R.; Monnerat, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.

PRABAGARAN, S. R.; PAKSHIRAJAN, K.; SWAMINATHAN, T.; JAYACHANDRAN, S. Media optimization of *Bacillus thuringiensis* PBT-372 using response surface methodology. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, Zagreb, v. 18, n. 2, p. 183-187, 2004.

Prabakaran G., Balaraman K. 2006. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Biol. Control 36: 288–292.

POOPATHI S, KUMAR KA. 2003. Novel Fermentation Media for Production of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Journal of Economic Entomology. p 1039-1044.

Qaim, M and A. deJanvry .2003. “Genetically Modified Crops, Corporate Pricing Strategies, and Farmers’ adoption: The Case of Bt cotton in Argentina.” American J. Agricultural Economics 85 (4):814-828.

Regnault-Roger, C., 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integrated Pest Management Reviews 2, 25-34.

Rigotto RM, Vasconcelos DP, Rocha MM. Pesticide use in Brazil and problems for public health. Cad. Saúde Pública 2014; 30: 1360-1362.

ROSAS- CASTOR, J.M., GUZMÁN- MAR, J.L., RAMIREZ, A.H., GARZAGONZALEZ, M.T., HINOJOSA-REYES, L. Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review, Science of The Total Environment, v.488- 489, p.176–187, 2014

Schlosser, U. G. Sammlung von Algenkulturen. Plant Biology, v. 95, n. 1, p. 181–276, 1982.

Salama, H.S. and Morris, O.N. 1993. History and usage of *Bacillus thuringiensis* in developing nations. In: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice (Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J. and Higgs, S. eds.). John Wiley & Sons, New York, 255–267PP

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of d-endotoxinas genes with different inseticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* 7.29. Molecular Microbiology, v.2, n.2, p.393-404.1998.

Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R.; Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 62, p. 775-806. 1998.

SENA, J.A.D.; HERNANDEZ RODRIGUES, C.S.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, p.2236-2237, 2009. DOI: 10.1128/AEM.02342-08.

SERRATOS, H. J. A., & JOSÉ, A. El origen y la diversidad del maíz en el continente Americano. Greenpeace. 2 ed. México, DF. 2012.

SHI, Y.; XU, W.; YUAN, M.; TANG, M.; CHEN, J.; PANG, Y. Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 97, n. 4, p. 757-765, 2004.

Shojaaddini, M.; Moharramipour, S.; Khodabandeh, M.; Talebi, A. A. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. *Journal of plant protection research*, v. 50, n.1 (2010).

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gardener, F. H., Prevenano, M. D., Fujimoto, C. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.

SOUZA, P. M.; BRAGA, M. J. Aspectos econômicos da produção e comercialização do milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Eds).

Soberón, M.; López-Díaz, J. A.; Bravo, A.; Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms; *Peptides*; Elsevier; 2012.

Swiecicka I, Bideshi DK and Federici BA. Novel Isolate of *Bacillus thuringiensis subsp. Thuringiensis*. That Produces a Quasicuboidal Crystal of Cry1Ab21 Toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 923–930 Vol. 74, No. 4, 2008.

Tecnologia de produção do milho. 2ª. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.1, p.13-53, 2004.

TABASHNIK BE, BRÉVAULT T, CARRIÈRE Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol* 3: 510–521, 2013.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L.J.; MEDRANO-ROLDÁN, H.; GARCÍAGUTIÉRREZ, C.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; GOMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R.S. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, v.4, p.143-152, 2001.

TRACY, W.F. Sweet corn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). *Specialty corns*. 2. ed. New York: CRC Press, 2001. p. 155-198.

Tiemann, U., 2008. In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reproductive Toxicology* 25, 316–326.

USDA. United States Department of Agriculture. U.S. Drought 2012: Farm and Food Impacts. Disponível em: [https://www.ers.usda.gov/Xu, D.](https://www.ers.usda.gov/Xu, D.;); Côté, J. C. Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* Flagellin (H Antigen) protein at the intra-H serotype level. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, p. 5524-5532. 2008.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Supply and Demand Estimates, n. 546, June 10, 2015a. Disponível em: < <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/waob/wasde//2010s/2015/wasde-10-092015.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2018

VALADARES-INGLIS, M. C.; SOUZA, M. T. & SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 208-217.

VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus. Sete lagoas: Embrapa, CNPMS. 1991. 23p. (Comunicado técnico, n. 15). *Bacillus thuringiensis subsp. medellin* by batch and fed-batch culture. *Biotechnology Techniques*, v.13, p.279-281, 1999.

VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. Circular Técnica, 2008

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; BARROS, E.C. Processo de Formulação do *Baculovirus Spodoptera* em Pó Molhável. *Circular Técnica 156*, 2010.

VALLEJO, F.; GONZÁLEZ, A.; POSADA, A.; RESTREPO, A.; ORDUZ, S. Production of *Bacillus thuringiensis subsp. medellin* by batch and fed-batch culture. *Biotechnology Techniques*, v.13, p.279-281, 1999. VIAN, C. E. F. Introdução à economia, Campinas: Editora Alínea. 2009.

VALLETE-GELLY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defenses. *Nature Reviews: Microbiology*, London, v. 6, n. 4, p. 302-313, 2008

VIAN, C.E.F.; Introdução à economia, Campinas: Editora Alínea.2009.

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

VLAK JM. 1993. Genetic engineering of Baculoviruses for insect control In: Whitten, M. J.; Oakeshot JG. eds. *Molecular approaches to pure and applied entomology*. New York: Springer-Verlag. p. 90-127.

VILARINHO, E. C. et al. Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil. *Florida Entomologista*, Lütz, v. 94, n. 3, p. 480-488, 2011.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.

VORA, D.; SHETNA, Y. I. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki* in oil seed meal extract media contain cystine. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 15, n. 6, p. 747-749. 1999

WAQUIL, M.S.; PEREIRA, E.J.G.; CARVALHO, S.S.S.; PITTA, R.M.; WAQUIL, J.M.; MENDES, S.M. Índice de Adaptação e Tempo Letal da Lagarta do cartucho em milho Bt. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.51, n.5, p.563-570, 2016.

Warren, G. W. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p. 109-121. *In* N. Carozzi and M. Koziel (ed.), *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. Taylor and Francis, London, United Kingdom.

WRAIGHT, C.L.; ZANGERL, A. R.; CARROLL, M. & BERENBAUM, M. R. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Washington, v.97, n.14, p.7700-7703, 2000.

YAMAMOTO. T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. *In*: CHARLES, J. F.; DÉLECLUSE. A.; LE ROUX, C. N. (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: kluwer, 2000. p. 81-100.

YANG, X.M.; WANG, S.S. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.28, p.95-98, 1998.

YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.; QU, S.S.; YU, Z.N. A microcalorimetric study of the biologic effect of Mn(II) on *Bacillus thuringiensis* growth. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.70, p.415-421, 2002. YAO, J.; LIU, Y.; TUO, Y.;

LIU, J.B.; CHEN, X.; ZHOU, Q.; DONG, J.X.; QU, S.S; YU, Z.N. Action of Cu²⁺ on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.39, n.6, p.576-580, 2003.

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

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3a lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.

ZANCANARO, P. O. et al. Avaliação de tecnologias de refúgio no cultivo de milho transgênico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 47, n. 7, p. 886-891, 2012.

Zhang, R. H.; Mustafa, A. F.; Zhao, X. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127 (3-4): 220-233

Zouari, N.; Jaoua, S. (1999). Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based medium. *Enzyme Microb Technol* 25:364-371