

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

"Produção, separação e bioensaio da exo
toxina termo estável de Bacillus thurin-
giensis, obtida por fermentação submersa".

Dra. Iracema de Oliveira Moraes

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E
AGRÍCOLA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE LIVRE DOCENTE NA ÁREA
DE BIOENGENHARIA.

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA GERAL

Pela compreensão, carinho e amor recebidos
no desenrolar deste trabalho, dedico-o:

Ao Edézio, meu querido marido

À Regina, Rosana e Rodrigo, meus
filhos

À Maria Goreti Grassi, minha de
dicada auxiliar.

INDICE

	Página
RESUMO	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Taxonomia	6
2.2. Aspectos químicos, bioquímicos e micro- biológicos da exotoxina.	13
2.3. Produção da exotoxina.	14
2.3.1. Isolamento e caracterização da exotoxina . . .	19
2.4. Padronização da exotoxina	26
2.5. Espectro de ação da exotoxina	28
2.6. Perspectivas de emprego da exotoxina	35
2.7. Inocuidade a vertebrados	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. Microrganismo	43
3.2. Insetos-Teste	43
3.3. Descrição dos equipamentos principais	43
3.3.1. Agitador incubador rotativo	43
3.3.2. Mini fermentador	44
3.3.3. Fermentador de 20 litros	46
3.4. Listagem dos equipamentos auxiliares	48
3.5. Outros materiais	49
3.6. Procedimento experimental	49
3.6.1. Composição dos meios de cultura	49
3.6.2. Preparo e esterilização do meio de cultura, nas duas escalas	51
3.6.2.1 Em mini fermentador	51

3.6.2.2.	No fermentador Chemap	51
3.6.3.	Preparo da semente	51
3.6.4.	Condições de operação	52
3.7.	Métodos analíticos	52
3.8.	Separação das toxinas obtidas	53
3.9.	Metodologia de concentração da exotoxina termo-estável	53
3.9.1.	Por concentração	53
3.9.2.	Por liofilização	55
3.9.3.	Por adição de inertes	56
3.9.4.	Por atomização em "spray dryer"	56
3.10.	Metodologia de semi purificação	57
3.11.	Metodologia de purificação	58
3.12.	Caracterização qualitativa da exotoxina	58
3.13.	Bioensaios	58
3.13.1.	Para <u>Drosophila melanogaster</u>	58
3.13.2.	Para <u>Ceratitis capitata</u>	59
3.13.3.	Para <u>Musca domestica</u> , <u>Chrysomya chloro-</u> <u>pyga</u> e <u>C. megacephala</u>	60
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1.	Processo fermentativo	61
4.1.1.	Comportamento do pH	61
4.1.2.	Consumo de açúcar	62
4.1.3.	Influência da concentração de oxigênio dissolvido durante a fermentação	62
4.1.4.	Variação da concentração de ácido di- picolínico durante a fermentação	65
4.2.	Separação e purificação das exotoxinas	65
4.2.1.	Processo fermentativo em mini fermenta- dor	65
4.2.2.	Em fermentador de 20 litros	69
4.3.	Caracterização química qualitativa	70
4.4.	Bioensaios	74
4.4.1.	Para <u>Drosophila melanogaster</u>	74

4.4.2.	Para <u>Musca domestica</u> , <u>C. chloropyga</u> e	
	<u>C. megacephala</u>	74
4.4.2.1.	Para <u>Chrysomya chloropyga</u>	74
4.4.2.2.	Para <u>Chrysomya megacephala</u>	77
4.4.2.3.	Para <u>Musca domestica</u>	77
4.4.3.	Para <u>Ceratitidis capitata</u>	78
4.4.3.1.	Ovos	78
4.4.3.2.	Pupas	79
4.4.3.3.	Insetos adultos	79
5.	CONCLUSÕES	83
6.	RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS	84
7.	BIBLIOGRAFIA	85
8.	AGRADECIMENTOS	100

INDICE DE QUADROS; TABELAS, ANEXOS, FIGURAS E FLUXOGRAMAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

TABELA 1 - Chave das espécies do grupo B. cereus.

TABELA 2 - Chave do grupo do B. thuringiensis.

TABELA 3 - Chave das variedades do B. thuringiensis.

FIGURA 1 - Curva de crescimento de B. thuringiensis.

FIGURA 2 - Concentração de "thuringiensin" nas células e meio de cultura.

FIGURA 3 - Espectro de absorção da preparação purificada.

FIGURA 4 - Fluxograma da separação das frações termo estáveis.

TABELA 4 - Análise das frações de exotoxina.

FIGURA 5 - Estrutura da exotoxina proposta por Farkas.

FIGURA 6 - Efeito da exotoxina sobre larvas de M. brassicae.

FIGURA 7 - Sobrevivência de larvas de D. melanogaster a diferentes concentrações de exotoxina e diferentes concentrações de extrato de levedura.

FIGURA 8 - Efeito da toxina termo estável de B. thuringiensis sobre os embriões de A. domestica.

FIGURA 9 - Período do ano e hospedeiros de larvas de triptídeos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

ANEXO 1 - Diagrama do mini fermentador.

ANEXO 2 - Esquema do fermentador de 20 litros.

FLUXOGRAMAS 1 a 7 - Concentração da Exotoxina.

FLUXOGRAMA 8 - Semi purificação da exotoxina.

4. RESULTADOS

FIGURA 4.1 - Comportamento do pH durante a fermentação.

FIGURA 4.2 - Consumo de açúcar durante a fermentação

QUADRO 4.1 - Comportamento da taxa de respiração e da velocidade específica de crescimento de B. thuringiensis, em relação à concentração de Oxigênio dissolvido.

FIGURA 4.3 - Variação da concentração de ácido dipicolínico durante a fermentação.

QUADRO 4.2.- Concentração dos mostos dos experimentos I a XIII.

QUADRO 4.3 - Tratamento de mostos dos experimentos XIV a XXII Bt A, Bt B e Bt P, pelos fluxogramas 4, 5, 6, 8.

QUADRO 4.4 - Semipurificação da exotoxina dos experimentos XXIII a XXVII.

QUADRO 4.5 - Tratamento dos mostos obtidos nos experimentos XXVIII a XXXII, em fermentador Chemap pelos fluxogramas 4, 5, 7 e 8.

ANEXO III - Leituras espectrográficas obtidas para a a mostra liofilizada de Bt A.

ANEXO IV - Leituras espectrográficas obtidas para a a mostra liofilizada de Bt B.

ANEXO V - Leituras espectrográficas para a amostra liofilizada de Bt P.

QUADRO 4.6 - Mortalidade de C. chloropyga com Bt B

QUADRO 4.7 - Mortalidade de C. chloropyga com Bt A

QUADRO 4.8 - Mortalidade de C. chloropyga com Bt P

QUADRO 4.9 - Mortalidade de C. megacephala com Bt A, Bt B, Bt P.

QUADRO 4.10 - Mortalidade de M. domestica com Bt A.

QUADRO 4.11 - Mortalidade de M. domestica com Bt B.

QUADRO 4.12 - Mortalidade de M. domestica com Bt P.

QUADRO 4.13 - Mortalidade de C. capitata na fase de pupa.

QUADRO 4.14 - Mortalidade diária de insetos adultos de C. capitata.

FIGURA 4.4 - Distribuição da mortalidade cumulativa de insetos adultos de C. capitata com o produto do experimento I.

FIGURA 4.5 - Distribuição da mortalidade cumulativa de insetos adultos de C. capitata com o produto do experimento V.

RESUMO

Com vistas à produção de insecticidas bacterianos foi estudada a fração solúvel e termo-estável denominada exotoxina, a partir de Bacillus thuringiensis. Foram empregados meios de cultura industriais contendo melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho.

O comportamento da fermentação nas duas escalas estudadas (1 litro e 20 litros) foi similar com relação ao pH, consumo de açúcar e cinética de crescimento, tendo os tempos, para complementar a fase exponencial, se reduzido de 10 horas na escala de 1 litro para 5 horas em 20 litros, ocasionando considerável aumento na produtividade.

Foi verificado o efeito da concentração de Oxigênio sobre o crescimento do microrganismo, observando-se a existência de uma faixa ótima no entorno de 10% do valor de saturação, ocasionando o máximo valor da velocidade específica de crescimento $\mu = 0,62 \text{ h}^{-1}$ em fermentador de 20 litros.

O acompanhamento da produção de ácido dipicolínico permitiu estabelecer a fase de máxima esporulação do microrganismo.

Estudos de concentração, liofilização e secagem bem como de semi purificação e purificação da exotoxina, comprovaram sua termo estabilidade e solubilidade em água.

Foram realizados bio ensaios com Dípteros para comprovar o potencial da exotoxina termo-estável, em Ceratitis capitata (mosca de frutas), Drosophila melanogaster, Chrysomya chloropyga, Chrysomya megacephala e Musca domestica. Os resultados encontrados confirmam a viabilidade tecnológica de produção e emprego da exotoxina termo-estável de Bacillus thuringiensis contra Dípteros, cuja maioria constitui praga da Agricultura e da Saúde Pública.

SUMMARY

The soluble and heat stable fraction of Bacillus thuringiensis was studied with the purpose of producing a bacterial insecticide by fermentation.

The fermentation course in the two scales investigated (1 l and 20 l) was similar in relation to pH, sugar consumption and kinetics of growth, the times required for the completion of the exponential growth phase being reduced from 10h in the 1 l scale to 5h in the 20 l fermentor thus ensuring a considerable productivity increase.

There was verified the effect of oxygen on the microorganisms growth in observing the existence of an optimum range of 10% of the saturation value; the maximum of specific growth rate being $0,62 \text{ h}^{-1}$ in a 20 l fermentor.

The study of dipicolinic acid production made possible to establish the maximum sporulation phase of microorganisms.

Investigation on the concentration, freeze drying and drying as well as of semipurification and purification of exotoxin proved its heat stability and solubility in water.

There were carried out bioassays with Diptera (Ceratitis capitata, Drosophila melanogaster, Chrysomya chloropyga, Chrysomya megacephala and Musca domestica) to prove the potential of heat stable exotoxin.

The results obtained confirmed the technological viability of production and of the use of heat stable exotoxin of Bacillus thuringiensis for combating Diptera, the majority of which is prejudicial to Agriculture and Public Health.

1 . INTRODUÇÃO

O Brasil se apresenta como um excelente campo para o desenvolvimento e a aplicação de inseticidas bacterianos.

Por um lado, o avanço tecnológico que se realiza no campo das fermentações industriais e a existência de matérias primas de excelente composição, em grande disponibilidade e a custos reduzidos. É o caso de resíduos de diversas indústrias, especialmente alimentícias que constituem subprodutos ricos em carboidratos e proteínas: melaço, água de maceração de milho, farelos, tortas e farinhas de soja, algodão, amendoim, peixe, etc.

De outro lado, o clima predominante nas diferentes regiões do país possibilitando a existência de um sem número de pragas que reduzem a produção agrícola, insetos estes tanto da ordem Lepidoptera como da Diptera. A necessidade de se aumentarem as fronteiras agrícolas, bem como de se garantirem safras com perdas reduzidas acarretadas por insetos e da minimização do emprego de inseticidas tóxicos exige a produção de inseticidas que sejam inócuos aos vertebrados e peixes afim de que pelo seu emprego o equilíbrio do ecossistema seja restabelecido.

Bacillus thuringiensis, bactéria mesófila, conhecida por sua atuação contra Lepidoptera devido a formação de um complexo espora-cristal proteico tóxico, identificado como delta endotoxina, produz por fermentação outras toxinas, destacando-se dentre elas a beta exotoxina também denominada toxina termo-estável.

Esta toxina é ativa especialmente no controle a Dípteros entre os quais se apresentam inúmeras espécies nocivas à humanidade, quer pelos danos que causam à Agricultura, quer pelas moléstias que transmitem ao homem e aos animais.

Por exemplo, a mosca de frutas (Diptera-Tripetidae), pelo seu potencial biótico e extraordinária capacidade de invasão vem ocasionando elevados prejuízos à fruticultura nacional. A mosca doméstica (Diptera-Muscidae), as moscas califórídeas (Diptera-Calliphoridae) são de importância médica e veterinária por serem transmissoras de microrganismos, por vezes, patogênicos ou causadoras de "bicheiras" através de suas larvas; causam enormes prejuízos à saúde humana e à pecuária.

Contam-se quase cem famílias na ordem Diptera dentre as quais, as espécies benéficas constituem minoria.

A erradicação dessas pragas ou a minimização de seus danos é tarefa que deve ser empreendida através de defensivos que não desequilibrem o ecossistema.

A utilização da toxina termo-estável do B. thuringiensis atende a esse propósito dada sua inocuidade aos vertebrados ao lado de sua efetiva ação no controle a Dípteros e diversas espécies de outras ordens.

1.1. Objetivo

Este trabalho objetiva conseguir:

- 1.1.1. Produção da exotoxina termo-estável.
- 1.1.2. Separação dessa fração das endotoxinas, ou inativação destas.
- 1.1.3. Concentração, semi purificação, liofilização ou secagem do produto obtido.
- 1.1.4. Verificação da existência de toxicidade a Dípteros, através de bioensaios.

Para conseguir este objetivo serão realizadas fermentações em duas escalas, a saber, em minifermentador e em fermentador de 20 litros.

Serão estudados os parâmetros e variáveis que influenciam o processo fermentativo visando sua otimização. Para os bioensaios serão escolhidos insetos adequados à realidade brasileira atual como indicadores da eficiência

do produto obtido.

A utilização dessa exotoxina virá reforçar o conjunto de soluções biológicas para os graves problemas causados por insetos.

Seu aproveitamento, paralelo ao das endotoxinas do B. thuringiensis, além de lhes ampliar o espectro de ação demonstrará, viabilidade econômica maior para produtos da fermentação, visto que, tanto a biomassa (endotoxinas), como o sobrenadante (exotoxinas) serão devidamente utilizados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Um interessante desenvolvimento no estudo do entomo patógeno Bacillus thuringiensis iniciou-se em 1959 - 1960 quando diversos pesquisadores confirmaram a capacidade desse microrganismo produzir também uma exotoxina termo-estável com poder inseticida a espécies de diversas ordens de insetos (7, 9, 10, 11, 12, 28, 52, 64, 65, 71).

Estudos anteriores haviam demonstrado a existência de um cristal proteico que se formava durante a esporulação formando um complexo espora-cristal tóxico a insetos da ordem Lepidoptera (1, 2, 3, 13, 27, 41, 55, 75, 77, 79, 81, 90).

Distingue-se a exotoxina do complexo espora-cristal ao menos em quatro aspectos: termo estabilidade a 121°C por 15 minutos, espectro das espécies de insetos suscetíveis, sintomas diferentes e existência de alguns sorotipos de B. thuringiensis não produtores do complexo endotóxico que são produtores da exotoxina termo estável.

Em entomologia definem-se as endotoxinas produzidas pelos microrganismos entomopatógenos como sendo aquelas toxinas ligadas à célula microbiana enquanto que as exotoxinas são aquelas excretadas no meio de cultura. Nesse sentido a toxina termo-estável do Bacillus thuringiensis é definida como exotoxina.

Em 1959 McConnell e Richards (71) verificaram que o sobrenadante autoclavado, separado do mosto fermentado de B. thuringiensis era tóxico quando injetado em larvas de Galleria mellonella, tendo obtido valores de dose letal média DL 50 como 0,3 µl/larva ou 2 µl/g de larva. Insetos de outras espécies: Ostrinia nubilalis, Sarcophaga bullata e duas baratas Periplaneta americana e Blata orientalis também apresentaram suscetibilidade em testes de injeção da toxina. A adição da exotoxina em dieta alimentar destes insetos apresentou resultado negativo.

Em 1960 Burgerjon e de Barjac (17) relataram sobre a toxicidade do sobrenadante autoclavado quando ministrado oralmente a alguns insetos da ordem Lepidoptera: Bombix mori, Pieris brassicae, Malacosoma neustria etc., à Coleoptera: Leptinotarsa decemlineata e à Himenoptera: Pristiphora pallipes.

Ainda nesse ano Briggs (12) verificou que o sobrenadante estéril de mosto bacteriano filtrado inibia o desenvolvimento da larva da Musca doméstica. O termo "fly toxin" ou "fly factor" fator responsável pelo vôo do inseto foi então adotado para descrever a entidade tóxica responsável, visto que o inseto quando não morria tinha suas asas deformadas, além de outros defeitos.

Simultaneamente Dunn (42) e Briggs (12) em 1960 e depois Mechalias e Beyer (72) em 1963 demonstraram que produtos comerciais obtidos de B. thuringiensis podiam ser ministrados a galinhas e vacas, sendo que a exotoxina remanescente nesses produtos mantinha sua atividade tóxica, atuando contra moscas cujas larvas ou pupas infestavam as fezes desses animais exercendo-se assim um controle sobre os insetos que viriam a desenvolver-se. Não sabiam se a exotoxina passava intacta através do trato intestinal do animal, ou se os esporos do B. thuringiensis contidos no complexo esporo-cristal tóxico, passando intactos, germinavam nas fezes produzindo novas quantidades de exotoxina.

Estudo sobre o efeito da exotoxina em Anagasta kuhniella foi desenvolvido por Yamvrias (101) em 1962. Sua pesquisa com o sobrenadante do mosto fermentado demonstrou atividade tóxica tanto injetando como na alimentação da larva. Comparou a velocidade de ação do componente tóxico obtido de duas variedades diferentes de B. thuringiensis mas limitou-se a um número pequeno de insetos e teve uma alta mortalidade no lote testemunha que prejudicou mas não invalidou seus resultados.

2.1. TAXONOMIA

Heimpel (55) em 1967 fazendo uma revisão do B. thuringiensis apresentou a taxonomia e discutiu os estudos desenvolvidos por diversos pesquisadores que estabeleceram chaves de identificação dos microrganismos pertencentes ao grupo do Bacillus cereus entre os quais figura o B. thuringiensis. A tabela 1 apresenta o resumo destes estudos.

TABELA 1 - Chave dos espécies do Grupo do B. cereus

A. Ausência de corpo paraesporal

- a) Produtores de ácido com xilose e arabinose, produzidos com nitrogênio amoniacal. Não produtores de Acetil metil carbinol e de fosfolipase. 1. Bacillus Megaterium.
- aa) Não produtores de ácido com xilose e arabinose. Produtores de Acetilmetilcarbinol e de fosfolipase C.
- bb) Saprofitas, as vezes patogênicos mas não causadores de antrax. As vezes móveis.
- c) Crescimento não rizoide em agar
2. Bacillus cereus
- cc) Crescimento rizoide em agar. Sempre móveis.
3. Bacillus cereus var mycoides
- bb) Patogênicos. Agente causal do antrax.
4. Bacillus antracis

B. Corpo paraesporal presente

- a) Corpo paraesporal liberado do esporângio e separado do esporo em 2 a 6 dias. Patogênico a larvas de lepidópteros.
- b) Não produtor de fosfolipase.

- c) Película formada e quebrada a flocos quando a cultura é agitada. Baixa toxicidade ao bicho da seda. Sorotipo I Berliner. Esterase tipo 1.
- d) Produtor de toxina termoe estável (Cantwell)
 - 5. Bacillus thuringiensis var thuringiensis
- dd) Não produtor de toxina termo-estável.
 - 6. B. thuringiensis var amuscatoxicus
- cc) Não formador de película. Mosto uniformemente turbido, ou quando agitado; cultura dispersa uniformemente no meio. Baixa toxicidade ao bicho da seda. Sorotipo VII. Aizawai Esterase tipo 5.
- e) Fermenta celobiose. Produtor de ácidos a partir de açúcares após de 22 dias de incubação.
- f) Produtor de toxina termo-estável.
 - 7. B. thuringiensis var. aizawai.
- ff) Não produtor de toxina termo-estável.
 - 8. B. thuringiensis var. pacificus.
- ee) Não fermenta celobiose. Não produtor de ácido após 14 dias de incubação.
- g) Pigmento róseo não formado quando cresce em agar gema de ovo.
- h) Sacarose positiva. Sorotipo IV sotto (Norris, The Classification of J. Appl. Bact. 27, 439-47, 1964). Esterase tipo 4.
- hh) Sacarose negativa. Sorotipo IV-a dendrolimus. Esterase tipo 4A.
 - 10. B. thuringiensis var. dendrolimus.
- hhh) Sorologia tipo IV-b. Esterase tipo 4B kenya.

gg) Pigmento róseo formado após vários dias de crescimento em gema de ovo. Sorotipo III. Esterase tipo 3. Alesti.

11. B. thuringiensis var. alesti.

bb) Não produtor de fosfolipase C.

i) Produtor de toxina termo-estável.

j) Salicina positivo, sacarose negativa. Sorotipo V. Esterase tipo 5 galleriae.

12. B. thuringiensis var. galleriae.

jj) Salicina negativo, sacarose positivo. Sorotipo VIII. Esterase tipo 8 Morrison.

13. B. thuringiensis var. anagastae.

ii) Não produtor de toxina termo-estável.

k) Altamente tóxico ao bicho da seda. Baixa toxicidade a Pieris brassicae. Não formador de película. Esculina debilmente positiva. Ácido formado de trealose, levulose e glicose após 20 dias de incubação a 32°C. Sorotipo VI. Esterase tipo 6. Entomocidus.

14. B. thuringiensis var. entomocidus.

kk) Baixa toxicidade ao bicho da seda. Altamente tóxico a Pieris brassicae. Formador de película. Esculina fortemente positiva. Ácido não produzido de trealose, levulose e glicose após 20 dias de incubação. Sorotipo VI. Esterase tipo 6.

15. B. thuringiensis var. subtoxicus.

aa) Corpo para-esporal firmemente ligado ao esporo, mesmo após meses de armazenagem. Não patógeno a lepidópteros.

l) Celobiose positiva a 48 horas. Antígeno flagelar presente. Sorotipo II. Esterase tipo 2.

16. B. thuringiensis var. finitimus.

11) Celobiose negativa após 20 dias de incubação. Ausência de antígeno flagelar. Sorotipo (antígeno H) não possível. Tipo esterásico desconhecido.

17. B. thuringiensis var. fowlery.

Nessa chave de classificação enfatiza que os microrganismos produtores da exotoxina termo-estável são os seguintes: B. thuringiensis var. thuringiensis, B. thuringiensis var. galleriae, B. thuringiensis var. aizawai e B. thuringiensis var. anagastae I, V, VII e VIII respectivamente. Afirma que a importância da produção da toxina termo-estável como subsídio à nomenclatura pode ser avaliada pela distinção de variedades produtoras e não produtoras dentro de um mesmo sorotipo. Assim B. thuringiensis var. amuscatoxicus; B. thuringiensis var. entomocidus e var. subtoxicus; B. thuringiensis var. pacificus são não produtores dos sorotipos I, VI e VII respectivamente.

Ainda em 1967 Burgerjon e de Barjac (20) reportam a presença de variedades produtoras no sorotipo 4 (4a, 4c) e no Sorotipo 9. Em contrapartida afirmam que não detetaram a presença de toxina termo estável em nenhuma das variedades de B. cereus por eles pesquisadas contrariando afirmação de outros pesquisadores. Nesse sentido, formulam a hipótese de terem sido estudados mutantes acristalíferos do B. thuringiensis e não B. cereus o que poderia ser confirmado por identificação sorológica.

Usando critérios bioquímicos e culturais de Barjac e Bonnefoi (35), em 1967 organizaram uma chave para o B. thuringiensis.

No ano seguinte Rogoff e Yousten (90) apresentam essa chave e comparam as variedades classificadas por de Barjac àquelas de Heimpel. A tabela 2, apresenta essa chave.

TABELA 2 : Chave do grupo do Bacillus thuringiensis

Reações bioquímicas				Esterase	Sorotipo	Nome usual	Variedade conforme Heimpel		
Acetilmetil carbinol +	Lecitinase(+)	Salicina (+) { Proteólise + Pigmento -	Sacarose + Película + Urease -	Esculina +++	Manose + Amido ++	berliner	1	thuringiensis ou berliner	thuringiensis amuscatoxicus
	Lecitinase(-)	Salicina (-) { Proteólise +++ Pigmento -	Sacarose - Película - Urease ++	Esculina +	Manose - Amido -	finitimus	2	finitimus	B. finitimus var. finitimus B. finitimus var. fowleri
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento +	Sacarose + Película - Urease -	Esculina +	Manose - Amido +	tolworthi	9	tolworthi	
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise +++ Pigmento -	Sacarose - Película - Urease ++	Esculina +	Manose - Amido -	galleriae	7	aizawai	aizawai pacificus
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento +	Sacarose - Película - Urease -	Esculina +	Manose - Amido +	kenyae	4a, 4c	kenyae	
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento +	Sacarose - Película - Urease -	Esculina +	Manose - Amido +	sotto	4a, 4b	sotto	sotto
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento +	Sacarose - Película - Urease -	Esculina +	Manose - Amido +	dendrolimus	4a, 4b	dendrolimus	dendrolimus
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento +	Sacarose - Película - Urease -	Esculina +	Manose - Amido ++	alesti	3	alesti	alesti
	Lecitinase(-)	Salicina + { Proteólise + Pigmento -	Sacarose - Película - Urease +	Esculina -	Manose - Amido +	galleriae	5	galleriae	galleriae
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento -	Sacarose + Película + Urease -	Esculina +	Manose - Amido +	morrisoni	8	morrisoni	anagastae
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise + Pigmento -	Sacarose + Película + Urease -	Esculina ++	Manose + Amido ++	entomocidus	6	subtoxicus	subtoxicus
	Lecitinase(-)	Salicina - { Proteólise +++ Pigmento -	Sacarose + Película - Urease -	Esculina +	Manose + Amido +	entomocidus	6	entomocidus	entomocidus

Rogoff e Yousten criticam o critério da produção de toxina termo estável usado por Heimpel para diferenciação, devido à necessidade de emprego de bio-ensaio para de terminação da presença ou não da exotoxina. Opinam que, en quanto não existir um teste químico "sensível" e "específico" para detetar a presença e identificar a exotoxina não deverá ser adotada como critério taxonômico, mesmo porque, a presença dela dentro de um mesmo sorotipo apresenta graus de toxicidade muito distintos. Exemplificam com o trabalho de Angus e Norris os quais encontraram para duas variedades do Sorotipo 1 valores de 0,2 e 65 µg/g de larva, o que resulta em toxicidade trezentas vezes maior para o mesmo tipo sorológico. Afirmam que a seleção de adjetivos particulares para subdividir um intervalo de valores é difícil e inevitavelmente sujeito a erros pessoais.

Em 1973 Burgerjon e de Barjac (21) estudam a presença da exotoxina nos sorotipos 10, 11 e 12 verificando a efetividade do sorotipo 10 var. darmstadiensis e a baixa produção de exotoxina pelos sorotipos 11 var. toumanoffi e 12 var. thompsoni.

O Manual de Bacteriologia de Bergey 8ª Ed. 1975 apresenta o B. thuringiensis distinguindo-o do B. cereus a cujo grupo pertence, pela patogenicidade a larvas de Lepidoptera e produção de cristal proteico tóxico durante a fase de esporulação. Com base em antígenos H divide-o em 11 sorotipos, um dos quais contém dois subtipos. Propostas foram feitas no sentido de dar aos sorotipos o caráter de variedade e diversos foram subdivididos em duas variedades conforme as propriedades bioquímicas e/ou patogenicidade. A tabela 3, apresenta os sorotipos e variedades, juntamente com os denominadores das mesmas. Não faz distinção entre produtores e não produtores da exotoxina.

TABELA 3 - Chave do *B. thuringiensis*

Sorotipo variedade	Autores
1. <u>thuringiensis</u> <u>thuringiensis ber-</u> <u>liner</u> <u>thuringiensis amus-</u> <u>catoxicus</u>	Heimpel e Angus, 1958 (56) de Barjac e Bonnefoi, 1967 (35) Heimpel, 1967 (55)
2. <u>finitimus</u>	de Barjac e Bonnefoi, 1967
3. <u>alesti</u>	Heimpel e Angus, 1958
4. 4a, 4b <u>sotto</u> <u>dendrolimus</u> 4a, 4c <u>kenyae</u>	Krieg, 1961 (68) de Barjac e Bonnefoi, 1967
5. <u>galleriae</u>	Heimpel, 1967
6. <u>entomocidus</u> <u>subtoxicus</u>	Heimpel, 1967 Heimpel, 1967
7. <u>aizawai</u> <u>pacificus</u>	Heimpel, 1967 Heimpel, 1967
8. <u>anagastae</u> <u>morrisoni</u>	de Barjac e Bonnefoi, 1967 de Barjac e Bonnefoi, 1967
9. <u>tolworthi</u>	de Barjac e Bonnefoi, 1967
10. <u>darmstadiensis</u>	Krieg, 1969 (70); de Barjac e Bonnefoi, 1967
11. <u>toumanoffii</u>	Krieg, 1969 (70)

A classificação de Norris (80) realizada em 1964 ba seou-se em esterases; mostrava concordância com os tipos sorolô gicos coletados por Bergey, salvo pelos sorotipos 5 e 7 que conforme ele pertenceriam ao mesmo grupo, devido ao comportamento bioquímico.

2.2. ASPECTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA EXOTOXINA.

Quimicamente a toxina termo-estável está relacionada a nucleotídeo de adenina. De Barjac e Dedonder em 1968 (37) isolaram um nucleotídeo, combinando cromatografia de papel e de coluna para extração, a partir de caldos de cultura de B. thuringiensis var. thuringiensis. A fração ativa apresentou um λ máximo a 260 m μ (pH = 2,0) e a análise química mostrou conter adenina, ribose e fosfato.

Em 1964 Cantwell et al (28) estudaram a produção da exotoxina e sua separação do meio de cultura. Verificaram que o composto tóxico era acompanhado por um componente que exibía um pico triplo no entorno de 270 m μ . Testaram com bons resultados, o produto parcialmente purificado em Musca autumnalis De Geer e Aedes aegypti.

Sebesta, Horska e Vankova em 1967 (93) reportaram que a exotoxina isolada de B. thuringiensis var. gelechia continha adenina, fosfato e diversos açúcares. Cada molécula continha dois grupos carboxilados e o peso molecular foi estimado em 850 baseado em equivalência com o AMP.

O acúmulo de nucleotídeo pelo B. thuringiensis foi considerado por Rogoff e Yousten (90) de grande interesse microbiológico por dois motivos: primeiro, porque, com uma única exceção, apenas mutantes auxotróficos são reportados como capazes de acumulação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos. A linhagem de B. subtilis reportada por Demain em 1964 (40) acumula ácido guanílico pela hidrólise do ARN excretado. Shieh, Anderson e Rogoff (96) em 1968 afirmam que as linhagens de B. thuringiensis que acumulam a exotoxina não são auxotróficos purínicos, embora certas linhagens selvagens requeressem aminoácidos para o crescimento. O segundo motivo é que o controle pela retroalimentação normal na síntese do nucleotídeo, deveria limitar o acúmulo daqueles compostos na linhagem selvagem. Excesso de acúmulo indica possível aberração no controle normal. Para aproximação do problema, Shieh e Rogoff estudaram uma

variedade de B. thuringiensis demonstrando que a adição de derivados purínicos a células excretoras da exotoxina diminuía o acúmulo, indicando que a inibição pela retroalimentação era operativa. Demonstrava ainda, que, as vias para o catabolismo de nucleotídeos eram operativas na linha-gem teste. Além disso os nucleotídeos não deveriam acumular-se em condições que permitissem atuação de nucleotidas-es, porém, a exotoxina de B. thuringiensis, é provavelmente resistente às mesmas.

Bond, Boyce, Rogoff e Shieh (11) em 1971 apresentaram as possíveis vias metabólicas envolvidas na síntese da exotoxina de B. thuringiensis.

Sebesta e Horska, em 1968 (94) demonstraram que o sistema enzimático da ARN polimerase de E. coli sofre inibição pela ação da exotoxina. Era uma inibição específica em que a exotoxina competia exclusivamente com o ATP. A reação era parcialmente reversível pelo ATP sendo inibida mesmo quando a adição de exotoxina se dava após o início da reação de polimerização. O grau de inibição era função da relação exotoxina/ATP sendo independente do nível de ATP.

Bachi, Motta, Barjac e Laurent (5) em 1977 afirmam que a exotoxina de B. thuringiensis quando aplicada a baixas concentrações, possui um efeito estimulante e não inibidor. Assim ocorreu ativação pela exotoxina sobre adenilciclase de eritrócitos de pombos e sobre ARN polimerase ADN-dependente de Sarcophaga bullata por concentrações de exotoxina entre 0,01 e 1 μ M.

2.3. PRODUÇÃO DA EXOTOXINA

McConnell e Richards (71) em 1959 estudaram a relação entre o crescimento e a produção da toxina termoss estável em meio de cultura líquido. Usaram 500ml de caldo

de fígado, inoculado com o microrganismo e incubado em agitador mecânico à temperatura de 30°C. Com amostras retiradas durante o processo fermentativo fizeram determinação do número mais provável de microrganismos viáveis e aplicaram bioensaios para verificação da toxicidade. A figura 1, ilustra esse experimento mostrando que a toxicidade atingiu seu máximo dentro das primeiras vinte e quatro horas de fermentação enquanto que a formação de esporos e cristal proteico tóxico ocorreu entre 30 e 36 horas. Notou que a agitação era necessária à formação de esporos, afirmando que em culturas não agitadas, apenas 1% das células esporularam, as remanescentes lentamente formaram pré-esporos, atingindo um máximo em 7 a 10 dias. No entanto a exotoxina foi produzida tanto nas culturas agitadas quanto naquelas sem agitação.

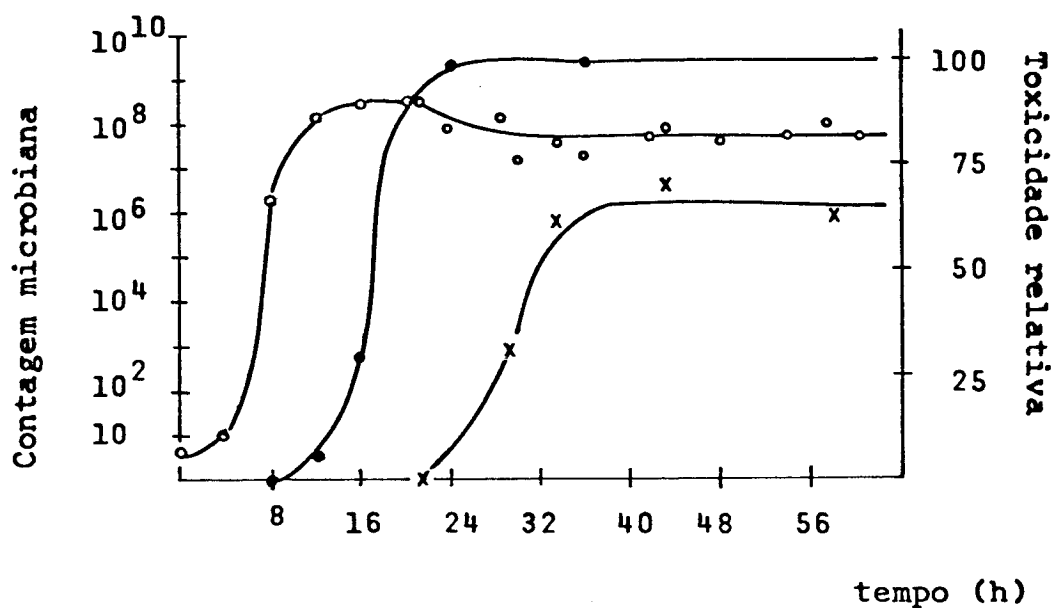


Figura 1 - Crescimento de *B. thuringiensis* cultivado em caldo de fígado (o). Efeito tóxico do sobrenadante autoclavado injetado a *Galleria* Sp (71)• Velocidade de germinação dos esporos, por aquecimento (x).

Em 1964 Cantwell et al (28) produziram a exotoxina em meio de cultura contendo caseína. Usaram frascos contendo 250 ml de meio de cultura inoculados com 1 ml de mosto pré-fermentado (18 horas). Os frascos foram levados a banho-maria a 32°C por 18 horas, borbulhando-se ar estéril através da cultura. Testaram outros meios de cultura, como caldo nutriente e caldo de infusão de coração. As células foram centrifugadas para separação do mosto fermentado, após 18 horas e o sobrenadante liofilizado. O pó obtido foi suspenso em água destilada, autoclavado e levado aos bioensaios para verificação da toxicidade.

Conner e Hansen (32) em 1967 estudaram os efeitos da adição de valina, leucina e isoleucina a meios sintéticos para produção de exotoxina com diversas variedades de B. thuringiensis. Leucina e isoleucina foram inibitórios e valina estimulante do crescimento do microrganismo, porém a produção da exotoxina foi muito melhor em meio de cultura complexo.

Rogoff et alii (89) em 1969 estudaram a ação de trinta e uma cepas de Bacillus thuringiensis contra cinco espécies de insetos. Os meios de cultura utilizados para fermentação denominados meio F e meio C compunham-se de:

Meio F (Fish)

Farinha de peixe	3%
Amido	1%
CaCO ₃	0,1%

Meio C (Corn)

Água de maceração de milho	3,3%
Farelo de algodão	2,0%
Melaço	1,0%
Caseína	3,0%
CaCO ₃	0,1%

Verificou que o meio F promovia o incremento de potência das endotoxinas, enquanto que o meio C promovia o desenvolvimento de exotoxinas. Utilizou como insetos-teste: Galleria mellonella, Trichoplusia ni, Heliothis/zea, Culex pipiens fatigans e Musca domestica.

Em estudos de produção e isolamento de exotoxinas Kim e Huang em 1970 (64) utilizaram-se do meio de cultura proposto por Megna em 1963 (73) composto de 10g/l de melão de beterraba, 30g/l de caseína, 33g/l de água de maceração de milho 20g/l de torta de algodão e 1g/l de carbonato de cálcio.

Faust em 1973 (44) apresenta uma análise objetiva da posição da exotoxina do B. thuringiensis, conclamando os pesquisadores, especialmente os entomopatologistas a uma investigação mais intensiva do assunto visando melhor aproveitamento dos produtos da fermentação.

Em 1973 é verificada a influência da concentração de glicose na produção da endotoxina (75, 92) e Moraes em 1976 (77) apresenta uma revisão da maioria dos meios de cultura empregados para produção do complexo esporo-cristal tóxico (endotoxinas) do B. thuringiensis por diferentes pesquisadores. Alguns deles estudaram a produção da exotoxina como consequência das pesquisas com as endotoxinas. Nesse trabalho o autor propõe a utilização de meios de cultura compostos de melão e água de maceração de milho, devido a disponibilidade e custo dessas matérias primas no Brasil, além de sua excelente composição. Verifica a relação existente entre pH, consumo de glicose e transferência de Oxigênio no crescimento e esporulação do B. thuringiensis. O produto endotóxico obtido foi testado contra Ascia monuste orseis (Lepidoptera).

Nesse mesmo ano, Moraes (76) patenteia um processo de produção de endotoxinas de B. thuringiensis por fermentação submersa.

Em recente informação Sebesta (95) afirma que a produção da exotoxina se dá durante a fase exponencial do

crescimento, completando-se na esporulação. A figura 2 ilustra essa produção, sendo a exotoxina denominada "thuringiensin". É interessante observar que a concentração de "thuringiensin" diminui na célula bacteriana entre 9 e 16 horas enquanto aumenta a concentração no sobrenadante da cultura.

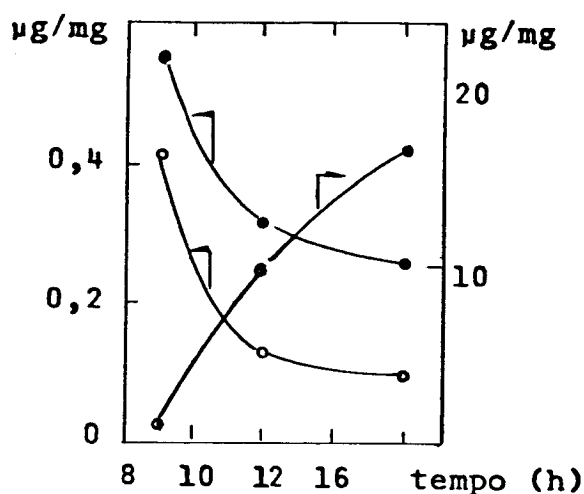


Figura 2 - Concentração de "thuringiensin" nas células bacterianas (o) e no meio de cultura (●). Concentração de ATP (●).

Em 1978, Moraes, Hokka e Nakamura (79) estudaram a cinética do crescimento e esporulação do B. thuringiensis em Mini-fermentador. Verificaram que a velocidade de consumo de glicose e o comportamento do pH durante a fermentação eram importantes parâmetros. A concentração celular, determinada como massa seca, foi máxima quando o teor de glicose ficou abaixo de 10% nas dez primeiras horas de fermentação, tendo-se o máximo de esporulação quando após essas dez horas o pH passou do entorno de 5,5 à neutralidade dentro das dez horas seguintes. A concentração de esporos foi determinada por correlação com a concentração de ácido dipicolínico analisado por espectrometria na biomassa seca.

Em pesquisas posteriores, Moraes, Hokka, Santana e Villarinho (79a) desenvolveram o modelo matemático do crescimento e esporulação do B. thuringiensis a fim de estabelecer as condições de projeto de um fermentador industrial. Foram determinadas as condições operacionais para o adequado suprimento de oxigênio, baseado na correlação entre potência aplicada, taxa de aeração e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

A influência da aeração e agitação na produção de B. thuringiensis levou Santana (91) a desenvolver pesquisa relativa ao assunto. Verificou que a faixa ótima de concentração de oxigênio para a máxima taxa de crescimento celular situava-se entre 7 e 10% do valor de saturação do oxigênio. Trabalhando em fermentador CHEMAP com 11 litros de volume útil obteve a velocidade específica de crescimento de $0,62 \text{ h}^{-1}$. As fermentações completaram-se em 5,5 h tendo a fase logarítmica duração de 2,0 horas.

2.3.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA EXOTOXINA

Segundo Faust (44) normalmente o B. thuringiensis var thuringiensis produz concentração aproximada de 50mg de exotoxina por litro do sobrenadante separado do mosto fermentado. Essa separação se faz por centrifugação, com posterior esterilização a 121°C , por 15 minutos, do fluido resultante. A purificação se faz por adsorção da exotoxina em carvão com posterior eluição com solução de etanol a 50%. O eluido é concentrado e cromatografado em papel, ou fracionado usando Dowex 1 em coluna. Após eluição com tampão formiato de amônia 0 - 1,5 M, efetua-se a dessalinização em Sephadex e o produto resultante é empregado em bioensaio para determinação da toxicidade.

Benz (7) em 1966 havia proposto uma semi purificação que embora não obtivesse uma preparação pura, permitiu-lhe caracterizar a natureza da exotoxina. O sobrenadante separado das células foi concentrado a um décimo de seu volume. Misturado a igual volume de etanol obteve-se um precipitado atóxico. Após 24 horas o sobrenadante foi decantado, adicionou-se mais etanol até que uma concentração alcoólica de 60% ocasionou nova precipitação de material não tóxico. Ao sobrenadante mistu-rou-se novamente o dobro do volume de etanol resultando numa concentração alcoólica final de 90% por volume. Após 24 horas o sobrenadante foi decantado e ambos sobrenadan-te e precipitado foram levados a bioensaio. Apenas o precipitado mostrou toxicidade. Este material foi dissolvido em água destilada e chamado de toxina pré-purifica-da. Desta fração foram tomados 20ml, misturados a pó de celulose até uma pasta espessa e se fez adição de 80ml de etanol. A mistura foi introduzida no topo de uma coluna de celulose com 20cm de altura e 10cm de diâmetro. Fez-se eluição com solução de etanol a 80% até que o eluido tornou-se incolor. Nenhuma das frações coletadas demonstrou toxicidade a larvas de Drosophila. Então a coluna foi eluída com solução etanólica a 75% e cinco das quinze frações de 200ml mostraram-se tóxicas sendo a mais tóxica a menos colorida. Todas as frações tóxicas apresentaram um máximo de absorção entre 258 e 260 nm e mínimo entre 230 - 234 nm. Máximo e mínimo foram mais pronunciados na fração mais tóxica e menos pronunciados na menos tóxica. As frações atóxicas não apresentaram máximo ou mínimo.

Em experimento posterior Benz empregou 50ml de toxina pré-purificada e fluiu através de uma coluna de troca de anions com Dowex 2, na qual a toxina foi adsorvida. A coluna lavada com água destilada, foi depois eluída com solução de ácido acético a 10% até obter eluí-

do sem cor. Estas frações foram atóxicas. Posterior eluição com KOH a 5% resultou numa fração neutra não tóxica e uma fração alcalina tóxica. Como a solução de hidróxido de potássio a 5%, também mostrou ser tóxica em testes de controle, foi a fração alcalina neutralizada com ácido perclórico, adicionado de dois volumes de etanol e o precipitado foi filtrado. Depois de evaporar o álcool, o evaporado mostrou-se extremamente tóxico. O espectro de absorção desta preparação apresentou um máximo a 260 nm e um mínimo a 233 nm, conforme se apresenta na figura 3.

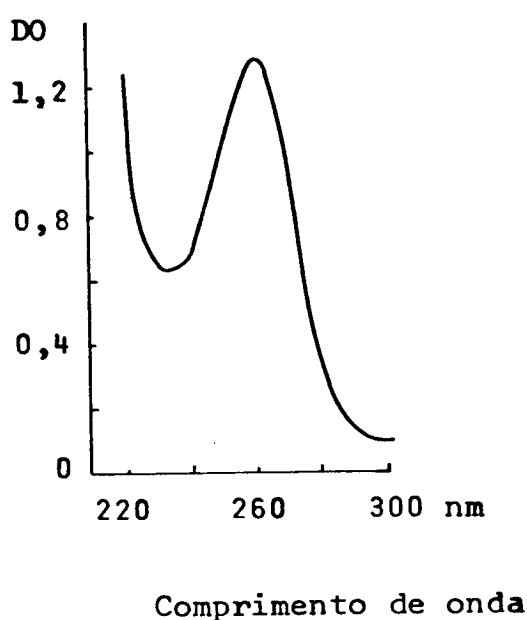
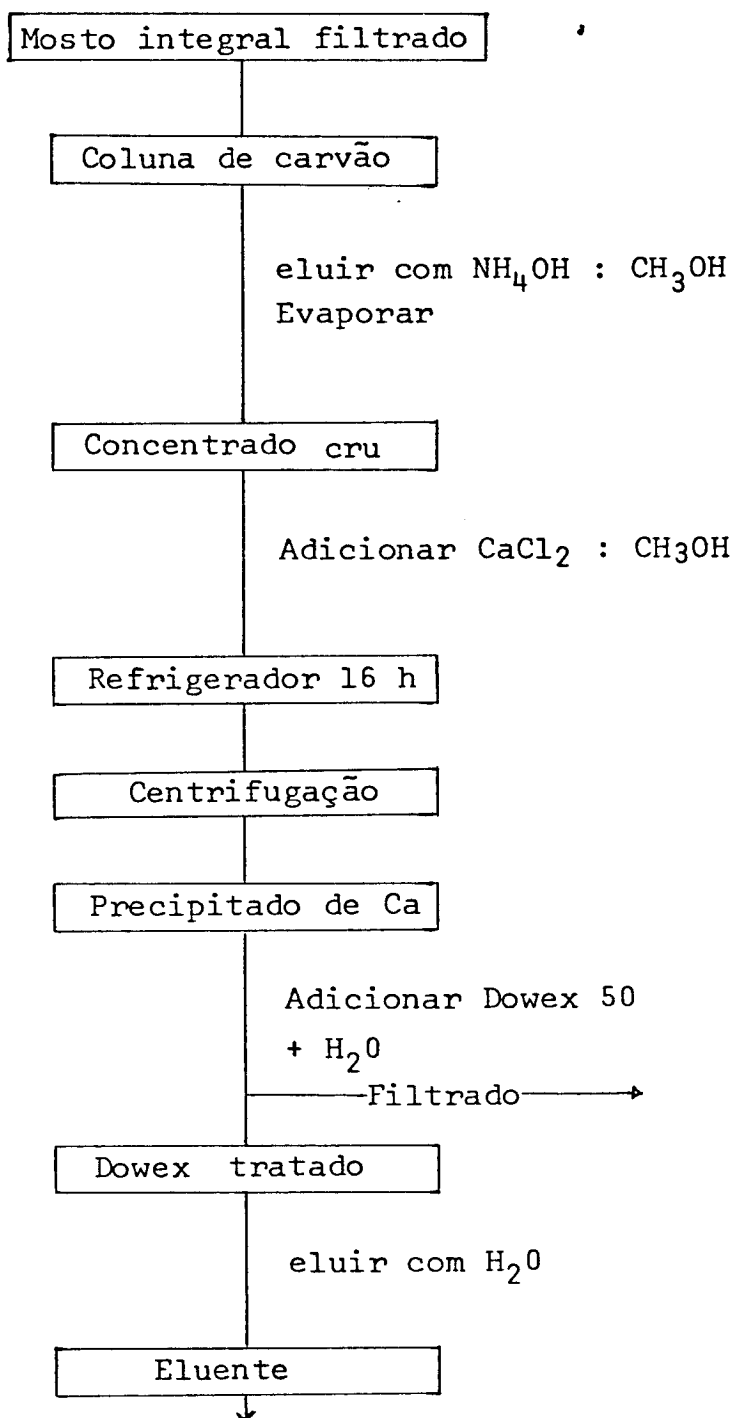


Figura 3 - Espectro de absorção da preparação purificada de exotoxina termo-estável de B. thuringiensis (7)

Este espectro corresponde aproximadamente àquele do ácido nucleico, entretanto como a toxina é facilmente dializável e solúvel em etanol em solução superior a 75% concluiu que ela deve ser uma molécula muito menor que a do ácido nucleico, acreditando que seria um nucleosídeo ou nucleotídeo de adenina ou uracil.

Purificação da exotoxina e análises complementares foram apresentadas por de Barjac e Dedonder (37) em 1968. O sobrenadante acidificado é precipitado por acetato de mercúrio, centrifugado, e ao creme é adicionado H_2S . O composto de enxofre e mercúrio é eliminado por centrifugação a $1^{\circ}C$ e o sobrenadante recolhido e aerado tem seu pH ajustado a 6,0 com hidróxido de sódio. Passa-se então à adsorção em carvão lavado com ácido e água e filtrado a vácuo. O material adsorvido é lavado várias vezes com ácido, água e solução de etanol a 50% para eliminar os sais e outros compostos que absorvem no UV. A toxina termo-estável foi então eluída com etanol amoniacal e o eluído concentrado a $40^{\circ}C$, rapidamente. Os contaminantes nucleosídicos são eliminados por precipitação do concentrado ajustado a pH 7,5 com acetato de bário em presença de dois volumes de etanol absoluto. O precipitado nucleotídico é lavado com solução de etanol a 66%, mantido em suspensão com um mínimo de água destilada e depois decomposto por H_2SO_4 . Forma-se sulfato de bário que é eliminado por centrifugação e o sobrenadante é desionizado por Amberlite IR120 e neutralizado por hidróxido de sódio. Após cromatografia em coluna de Dowex a $4^{\circ}C$ é eluído por ácido clorídrico 0,01N, tem seu pH ajustado a 5,0 e é concentrado por evaporação a temperatura inferior a $40^{\circ}C$. Elimina-se o cloreto de sódio formado, por diálise a frio com água destilada durante duas horas. Pelas análises complementares da exotoxina purificada constatou a presença de adenina, ribose e fosfato na relação 1:1:1 e verificou a ausência de aminoácido e enxofre. O peso molecular foi estimado em 707. Por filtração da toxina em geis de dextrana, comparando-se a nucleotídeos de peso molecular conhecido obtiveram valores entre 700 e 800, enquanto que por análise elementar, considerando que todo o nitrogênio fosse proveniente da adenina estimaram o peso molecular em 707.

Kim e Huang (64) em 1970 descreveram o processo usado para isolar exotoxinas puras de B. thuringiensis var. thuringiensis através do fluxograma da figura 4 apresentando os resultados das análises das frações separadas durante o isolamento na tabela a seguir:



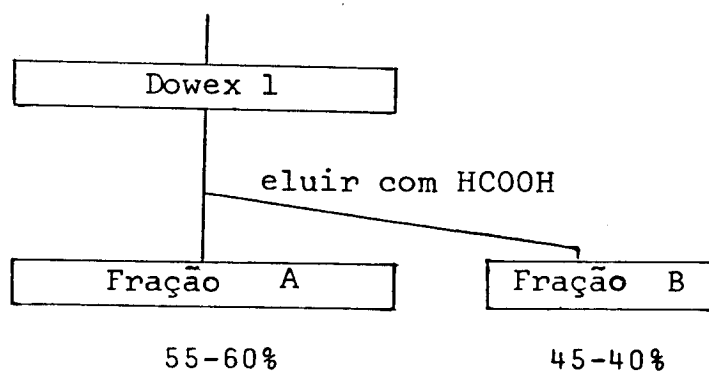


Figura 4 - Fluxograma da separação das frações de exotoxina termo-estável de B. thuringiensis (64).

Tabela 4 - Análise das várias frações de exotoxina durante o processo de purificação.

Fração	Toxicidade		DO 258/238	Fosfato ligado (a)	Pentose ligada (b) µM/mg
	U/mg	% recupe ração			
Mosto inte- gral	40	100	0,89	-	-
Eluido do carvão	400	70	1,20	0,4	0,5
Precipitado c/cálcio	1500	54	2,20	0,95	1,0
Eluido Dowex 50 H ⁺	2000	15	2,50	1,10	1,15

a) teste de Fiske subarow

b) teste de Orcinol

Ao final do processo de purificação os filtrados da coluna de Dowex foram liofilizados resultando 17g de um sólido cinza brilhante com 2000 U/mg (unidades por miligrama), para um

volume de mosto integral de 400 litros com 1500 U/ml. O espectro de absorção ao UV do mosto integral apresentou apenas absorção final e o cru concentrado apresentou um máximo definido a 258 mμ. Este pico tornou-se mais pronunciado com a purificação posterior como se constata da relação DO/mg entre 258 mμ/238mμ bem como na leitura de DO/mg (leitura de densidade ótica de 1 mg/ml de solução) a 258 mμ. O peso molecular da exotoxina foi estimado em 700. As frações tóxicas obtidas por Kim e Huang foram classificadas como "thuringiensin" A e "thuringiensin" B tendo obtido 60% de A e 40% de B.

Uma revisão dos componentes químicos da exotoxina foi realizada por Bond et al (11) em 1971, transcrevendo os esquemas das reações envolvidas, propostas por Farkas (43) até obter a estrutura da exotoxina que se apresenta na Figura 5.

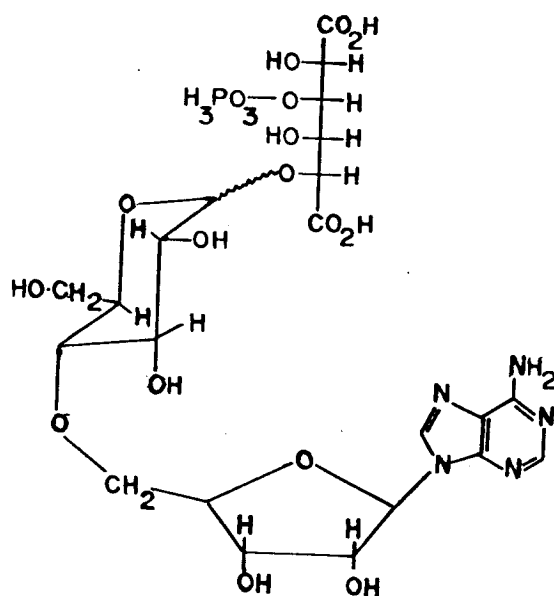


Figura 5 - Estrutura da exotoxina proposta por Farkas

Afirma o autor que essa estrutura proposta sumariza regularmente nosso conhecimento de química da exotoxina porém deve ser tratada com circunspeção no momento.

A identificação de exotoxina isolada de Bacillus thuringiensis sorotipo 4a - 4c foi realizada por Pais e de Barjac (84) em 1974. Por degradação química, espectrometria de ressonância nuclear magnética com Carbono treze e espectroscopia de massa, demonstraram ser essa exotoxina idêntica à "thuringiensin" anteriormente isolada do sorotipo 1 em 1965. Empregaram a metodologia de Kim e Huang (64) obtendo de 200 l de mosto fermentado 4,1g de exotoxina bruta.

2.4. PADRONIZAÇÃO DA EXOTOXINA

Os experimentos iniciais realizados para verificar a atuação da exotoxina por de Burgerjon e de Barjac (19) em 1962 mostraram resultados positivos, porém nada conclusivos a respeito da potência dessa fração tóxica obtida na fermentação de Bacillus thuringiensis afirmando ser lenta a ação, necessitando grandes doses de sobrenadante para Lepidoptera. Para outras ordens de insetos, especialmente aquelas resistentes ao complexo espora-cristal, o sobrenadante foi bastante tóxico.

Para a padronização do complexo endotóxico há uma série de publicações (45,46, 69,78) em todas elas a concentração de esporos foi o elemento considerado, sendo verificada a potência do inseticida somente através de bioensaios.

Burgerjon em 1965 (15) critica a forma de padronização de produtos obtidos de B. thuringiensis devido ao significado relativo e contestável da contagem de esporos sobre a toxicidade do produto. Menor relação existe entre a toxina termo estável e essa contagem efetuada afim de satisfazer legislação federal nos Estados Unidos da América. O autor enfoca trabalhos de diversos pesquisadores que estão utilizando a exotoxina para controle de Dípteros de curral, de estábulo, etc.. Estas pesquisas de

monstram mais claramente o hiato existente para a padronização desta exotoxina que nada tem a ver com o complexo esporo cristal-tóxico. Propõe a utilização de uma preparação padrão de referência, obtida do sobrenadante filtrado autoclavado, da fermentação de B. thuringiensis var. thuringiensis em vez de fazer uso de um único inseto-teste referência. Desde que essa preparação padrão seja disponível, cada produtor poderá padronizar seu produto por referência, usando o inseto-teste preferido e as técnicas consequentes. A autoclavagem do produto a testar assegurará que se compara matéria ativa idêntica do padrão e do produto. Para determinar o título do produto em Unidades de Toxina Termo estável ter-se-á: "x" gramas de produto contém "y" cm³ de toxicidade padrão ou "q" Unidades de Toxina Termo estável.

Em 1974 Charmoille et al (31) apresentaram um método que consideram simples e econômico, de determinação fiel e reprodutível da medida de atividade biológica de diferentes preparações, prescindindo de dosagem química e de contagem de esporos, seja para o complexo esporo cristal, seja para a exotoxina termoestável. A concentração letal média é determinada graficamente da relação entre mortalidade e concentração, em papel probabilístico normal. Compara-se este valor àquele obtido para CL50 de uma preparação padrão. Para a toxina termoestável o inseto-teste foi a Musca domestica. Realiza-se o bioensaio com 100 ovos depositados sobre 50 ml de meio de cultura de agar nutriente com concentrações crescentes de toxina. As larvas incubadas a 28 - 30°C e 70% de umidade relativa se alimentam desta dieta. As larvas sobreviventes se metamorfoseiam, as pupas formadas são conservadas até a emergência dos adultos. A mortalidade é calculada pelo número de moscas que emergem e os ovos introduzidos, corrigida eventualmente pela fórmula de Abbot. O método atende perfeitamente os imperativos de controle no decorrer da produção. O autor acha-o preferível ao método

oficialmente reconhecido nos EUA, cujos inconvenientes são a escolha de um inseto-teste não universalmente conhecido ou existente e a elaboração de testes de rotina necessitando material e pessoal especializado.

De Barjac e Lecadet (38) em 1976 apresentam uma metodologia para a dosagem bioquímica da exotoxina, utilizando os substratos usados para a dosagem de ARN-polimerase, afirmando haver uma boa correlação entre este e o método de aplicação de bioensaio.

2.5. ESPECTRO DE AÇÃO DA EXOTOXINA

Os experimentos iniciais com a exotoxina demonstraram a suscetibilidade de Galleria mellonella, Periplaneta americana, Blata orientalis, Pyrausta nubilalis, Sarcophaga bullata além de Aedes aegypti, por injeção do sobrenadante autoclavado a 120°C durante 15 minutos, nas pesquisas de McConnell e Richards (71) em 1959.

No mesmo ano Hall e Arakawa (53) demonstraram que 0,25g de mosto integral de B. thuringiensis obtido por fermentação em laboratório, causavam 90 a 100% de mortalidade à Musca domestica tanto a não-resistente quanto a resistente a DDT e Malation.

Usando preparações comerciais do complexo esporo cristal Briggs (12) em 1960 desenvolveu séries de experimentos com larvas de mosca doméstica, concordando com McConnell que a toxina atuando em Diptera era uma fração solúvel em água.

Estudos de Burgerjon e de Barjac (18) nesse mesmo ano, para verificar a atuação da toxina por ingestão livre, mostrou a necessidade de grandes volumes de filtrado para obter toxicidade igual a obtida com a solução aquosa do complexo esporo cristal. Constataram que os insetos tratados com o mosto integral apresentavam uma velocidade de morte elevada. Os tratados com o filtrado da fermentação

autoclavado, apresentaram uma velocidade mais lenta, porém a taxa de mortalidade foi muito maior, principalmente comparando-se com a taxa obtida pela ingestão do complexo esporo-cristal tóxico. Aparentemente ocorreu um efeito sinérgico. Os autores classificaram os insetos testados quanto ao complexo esporo-cristal tóxico em: muito sensíveis: Bombix mori, Pieris brassicae Malacosoma neustria; medianamente sensíveis: Mamestra brassicae; Polia oleracea, Porthetria dispar e Pristiphora pallipes; pouco sensíveis: Euxoa segetum, Lycophotia saucia e Leptinotarsa decemlineata. Para com a toxina termo estável a suscetibilidade dos tres grupos foi similar.

Visando estabelecer doses letais comparando exotoxinas obtidas de diferentes variedades de B. thuringiensis com aquela considerada cepa padrão, Burgerjon e de Barjac (19) em 1962, efetuaram bioensaios sobre larvas de Mamestra brassicae, terceiro instar. Folhas de couve cortadas em círculos de 3,85 cm de diâmetro foram tratadas com a exotoxina nas duas faces. Cinco a seis larvas em cada lote de folhas, se alimentaram durante dois dias das folhas tratadas, a temperatura de 25°C, passando depois a folhas não-tratadas. As larvas que aparentemente não haviam sofrido o efeito tóxico, bruscamente passam a senti-lo nos dias subsequentes conforme se apresenta na Figura 6.

Foram utilizadas dosagens até 8 vezes maior que a exotoxina padrão, obtida de B. thuringiensis Berliner sorotipo 1.

Burgerjon e Biache (22) em 1964 verificaram a atividade da exotoxina de B. thuringiensis em teste de campo contra larvas de Diprion pini, tendo antes testado em laboratório tanto a exotoxina com sucesso, como o complexo esporo cristal que mostrou efeito negligível. Dose igual a utilizada em laboratório foi usada no campo sem adição de qualquer outra substância ao filtrado esterilizado da fermentação de B. thuringiensis Berliner. Oito coletores para larvas mortas e excrementos foram colocados em tres

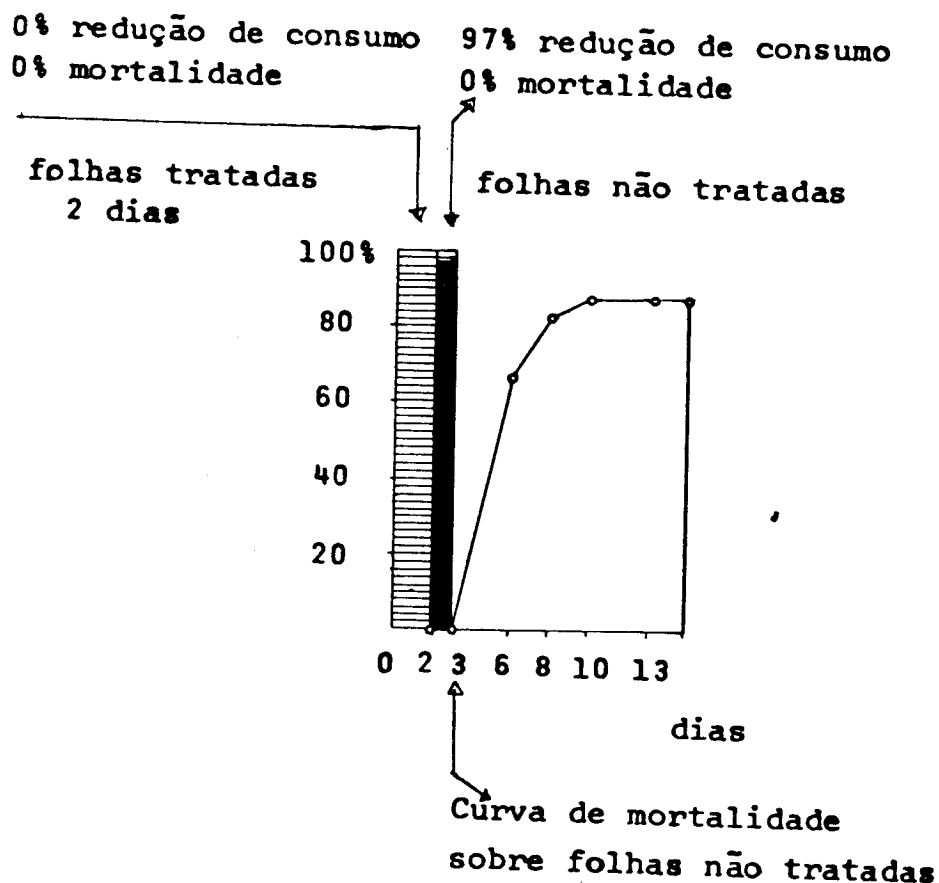


Figura 6 - Exemplo do efeito da exotoxina sobre larvas de Mamestra brassicae L. (19).

árvores tratadas, e oito em tres não tratadas com a exotoxina. Os resultados encontrados para mortalidade, foram similares aos de laboratório sendo encorajador para o desenvolvimento de produto baseado na toxina termo estável para ser usado em controle integrado.

Cantwell, Heimpel e Thompson (28) em 1964 apresentaram o método de produção da exotoxina, primeiros estudos de isolamento e purificação, método de bioensaio e o efeito do agente isolado, contra um restrito grupo de Diptera. A exotoxina estudada foi obtida de B. thuringiensis var. thuringiensis, var. entomocidus e var. finitimus cultivados em frascos com 250 ml de meio de cultura a 32°C durante 18 ou 72 horas. Agitação a 90 rpm e aeração por borbulhamento de ar. O sobrenadante autoclavado foi tóxico a mosca doméstica a concentrações de 12,5; 25 e 50 mg. O autor alerta os produtores que removendo o sobrenadante por centrifugação e descartando, também estarão descartando a

exotoxina.

Ainda em 1954, Burgerjon, Grison e Kachkouli (25) verificaram a atuação da toxina termo-estável de Bacillus thuringiensis Berliner e B. thuringiensis var. dendrolimus em Locusta migratoria (Orthoptera) usaram 36 ml de sobrenadante autoclavado obtendo respectivamente 100% e 8% de mortalidade.

A incorporação do filtrado da fermentação de B. thuringiensis sem autoclavar, foi feita em ração animal por Burgerjon e Galichet (24) em 1965. Usando Musca domestica compararam a atividade tóxica do filtrado e do complexo esporo cristal. O primeiro apresentou 100% de mortalidade e o segundo mostrou-se atóxico. Os autores reforçaram a tese do emprego mais racional do B. thuringiensis para o controle de pragas, pela preparação não apenas do complexo mas também da toxina termo estável com um produto industrial distinto.

No ano seguinte Burgerjon e Biache (23) mostram a conveniência do emprego de B. thuringiensis em lugar de inseticidas polivalentes. Estudam a alimentação de Perillus bioculatus por longo tempo (7 dias, 25°C) com larvas de Leptinotarsa decemlineata fortemente intoxicadas com a toxina termo-estável. Há uma mínima diferença entre os lotes alimentados com as larvas intoxicadas e o lote testemunha. É interessante, friza o autor, mais pesquisa visando a recuperação, purificação ou síntese da toxina termo-estável para aumentar a gama de inseticidas seletivos disponíveis, ampliando as possibilidades de controle integrado.

O sorotipo 4:4a, 4c foi apresentado como produtor da exotoxina em 1967 por Burgerjon e de Barjac (20) com seis cepas isoladas desse sorotipo demonstraram que duas delas produzem a exotoxina com velocidade elevada. O teste de toxicidade foi realizado em Pieris brassicae. O sobrenadante autoclavado foi ingerido pelas larvas em terceiro instar e obtiveram mortalidade de 77 e 96% contra

81% do padrão (sorotipo 1) com seis dias, 79 e 100% contra 88% para dez dias. Além da mortalidade encontrada também importam os aspectos referentes à atividade teratogênica da exotoxina, nesse inseto.

A influência da composição da dieta do inseto, na atividade da toxina termo-estável foi verificada por Benz e Perron em 1967 (9) e Perron e Benz (86) em, 1968. Estudando a ação da exotoxina contra larvas e pupas de Drosophila melanogaster verificaram que essa atividade é marcadamente reduzida pela presença de levedura ou extrato alcoólico de levedura. Dieta contendo 2% de levedura apresentou valores de concentração letal média para mortalidade larval, pupal e total 167; 224 e 197% maiores que aquelas dietas sem levedura. Os autores estudaram o efeito antagônista da levedura na ação da exotoxina contra Drosophila melanogaster, sendo que a figura 7 ilustra esse efeito.

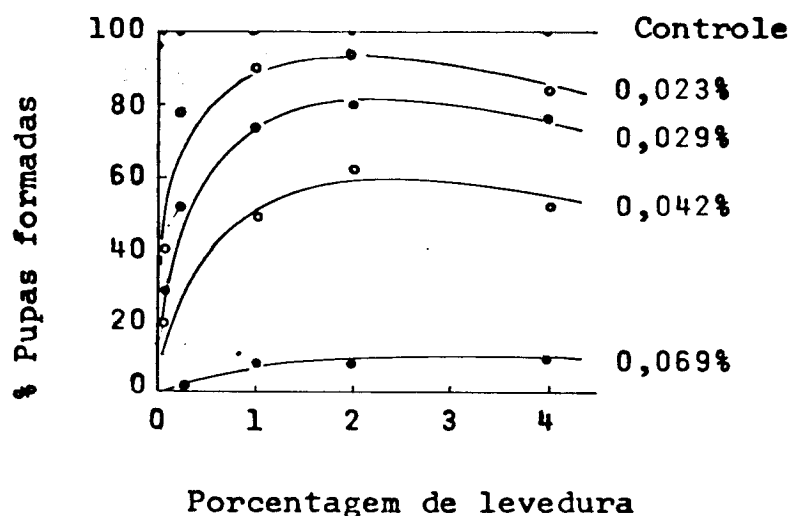


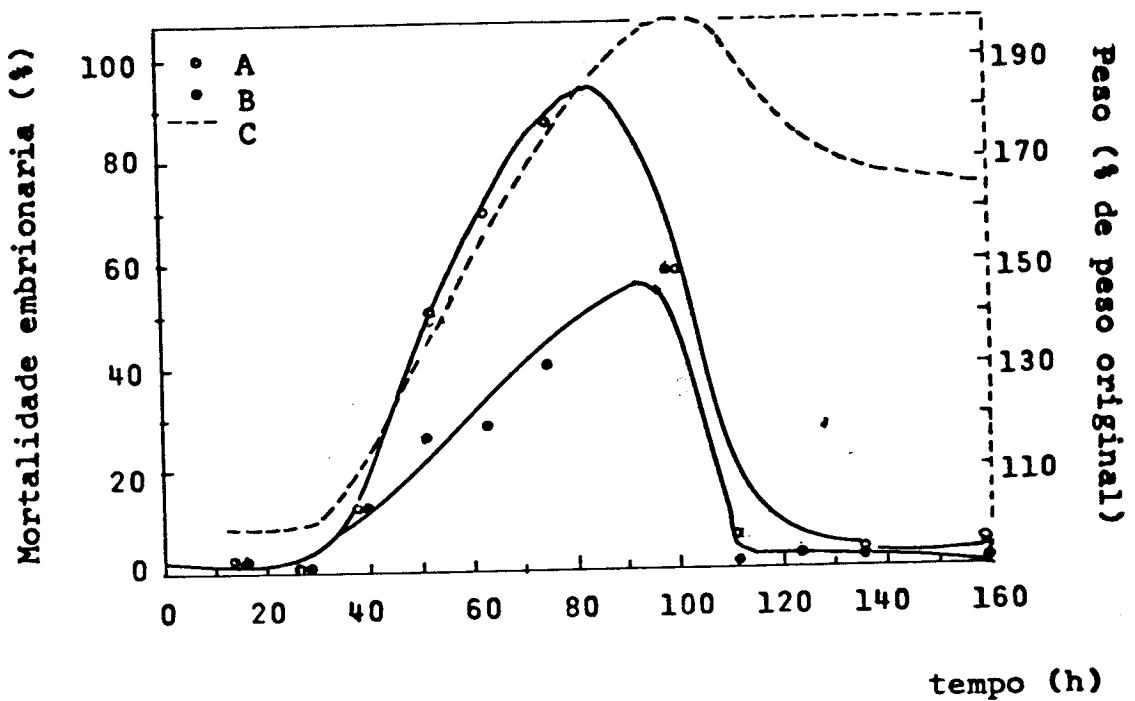
Figura 7 - Sobrevivência de larvas de Drosophila melanogaster a diferentes concentrações de extrato de levedura.

Os autores esperam que com o conhecimento da natureza química do anticida haverá indicações do modo de ação da exotoxina contribuindo para novos desenvolvimentos no campo

dos inseticidas "biológicos" mais específicos.

Zemp (102) em tese de doutorado em 1969, desenvolveu um método biológico para teste de preparações comerciais baseados em B. thuringiensis usando a larva de Musca domestica. Desenvolveu um meio de cultura sólido constatando que 98% da exotoxina é produzida dentro das doze primeiras horas e que adição de 0,1% de estreptomicina e/ou levedura ao meio de cultura inibe a produção e/ou ação da exotoxina. Testou outro meio de cultura, semi-sólido com farelo de trigo que foi mais adequado aos biotestes. Também neste meio a presença de levedura bem como nipagin (1 mg/g meio) inibem a ação da exotoxina contra a larva da mosca. No estágio de pupa e provavelmente para larvas jovens, o nipagin sinergisa a ação da exotoxina, bloqueando a ação inibidora da levedura. Altas concentrações do complexo esporo cristal também podem atuar como sinergistas. Conclui que a melhor determinação da concentração letal média é realizada na pupa porque esta não é influenciada pelos outros compostos, além da toxina bacteriana. Todas as dosagens realizadas por ele são referentes a um padrão com 1000 unidades exotoxina/g. Assim como Pieris brassicae é o melhor inseto teste para o complexo esporo-cristal a Musca domestica o é para a exotoxina.

Em 1972 Tremblay et al (99) estudaram a penetração da exotoxina através da membrana de Acheta domesticus, baseado na permeabilidade dos ovos à água e ao fato da exotoxina ser dializável. Utilizaram B. thuringiensis sorotipo 1 em meio de cultura incubado a 30°C por 36 h com aeração contínua. A exotoxina foi extraída conforme procedimento de Benz (7) e o precipitado obtido foi dissolvido em água e conservado a 2°C. Com duas concentrações correspondentes a 15 e 30 vezes aquela do meio de cultura obteve resultados que mostram que a exotoxina penetra nos ovos entre 30 e 110 horas perturbando o desenvolvimento embrionário. Obteve uma diferença entre 20 e 30 h. a máxima penetração da água e da exotoxina respectivamente, conforme se verifica pela figura 8.



A - exotoxina pré purificada 50%; B - 25%; C - penetração de água.

Figura 8 - Efeito da toxina termo-estável de B. thuringiensis sobre os embriões de Acheta domestica

Burgerjon e Grison (26) em 1971 estudaram os efeitos da aplicação de B. thuringiensis (complexo esporo cristal e exotoxina), no potencial biótico de Zeiraphera diniana. Obtiveram uma taxa reduzida de fertilidade quando trataram as larvas de último instar com doses subletais de exotoxina ou da mistura de endo e exotoxina.

Ainda em 1971 Ignoffo e Gregory (63) verificaram os efeitos da exotoxina na maturação larval, longevidade do adulto, viabilidade e fecundidade do ovo em várias espécies de Lepidoptera. Em Heliothis zea, Heliothis virescens, Trichoplusia ni, Spodoptera exigua, Estigmene acrea e Pectinophora gossypiella ocorreu inibição do desenvolvimento da larva e do adulto. Fecundidade e longevidade foram reduzidas. Ovos de T. ni aparentemente não afetados pelo tratamento originaram larvas cujo desenvolvimento foi muito afetado.

2.6. PERSPECTIVAS DE EMPREGO DA EXOTOXINA NO BRASIL

Além das pragas já constatadas como suscetíveis à exotoxina termo-estável pelos pesquisadores do exterior, a Agricultura brasileira se ressentia pela atuação nociva da Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera - Tephritidae) enquanto que na área médico-sanitária destacam-se moscas transmissoras de moléstias, tais como Chrysomya chloropyga, C. megacephala e C. albiceps (Diptera calliphoridae) cuja suscetibilidade à exotoxina pode ser demonstrada.

Ceratitis capitata é uma das mais importantes pragas de frutos encontrada em várias partes do mundo. Conhecida como a "mosca do Mediterrâneo" é uma espécie exótica originária da África, constatada no Brasil por volta de 1900 (57, 59, 83, 87), desenvolveu-se a velocidade muito maior que as espécies nativas por encontrar em nosso país clima propício e condições para sua multiplicação e desenvolvimento praticamente durante o ano todo.

Em 1905 Hempel (57) reportou a visita do pesquisador Compere ao Brasil o qual tendo publicado acerca de parasitas de "bicho de fruta" (Ceratitis capitata), teria afirmado que esse inseto não viria a se constituir no Brasil, a praga terrível que era em outros países devido a existência de parasitas (himenópteros e coleópteros) que o combateriam.

Em 1918 o Boletim nº 640 da USDA listou as 40 frutas que eram marcadamente atacadas pelo inseto, 14 as medianamente atacadas e as 18 raramente infestadas. Observou o autor que praticamente todos os frutos comestíveis são marcadamente infestados não o sendo o abacaxi e a banana.

Fonseca em seu Manual de Citricultura (47) apresenta as principais frutas atacadas: café, goiaba, pera, maracujá, sapoti, araçá, cajá, fruta do conde, caqui, pêssego, ameixa, jaboticaba e as frutas cítricas, entre outras. A Ceratitis capitata mostra acentuada preferência pelas

cerejas de café em cuja polpa suas larvas se desenvolvem e terminada a colheita do café emigram para pomares circunvizinhos à procura de outras frutas para alimento e desova.

Em 1934 o mesmo autor (48) relata as principais pragas observadas nos anos 1931-1933 nas plantas de maior cultivo no Estado de São Paulo. Observa que os ataques de C. capitata são frequentes e prejudiciais devido a sua importação ter sido feita desacompanhada de seus parasitas naturais que, onde existem, restabelecem o equilíbrio ecológico tornando-a relativamente pouco prejudicial. Acrescenta à lista de frutas, as cucurbitáceas (melancia, pepino, chuchu, abóbora).

Em 1965 Puzzi, D. e Orlando A. (87) estudaram a ecologia das moscas de frutas no Estado de São Paulo, visando o controle racional da praga sendo que a sequência de hospedeiros foi considerada o principal agente atuante sobre a população dos tripetídeos. A figura 9 apresenta o período do ano em que os frutos são atacados dando uma idéia da sequência eventual dos diversos hospedeiros.

PLANTAS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Café												
Pessegue												
Citrus												
Caqui												
Uvaia												
Araçá												
Goiaba												
Maracujá												
Sapoti												
Nêspera												
Ameixa												
Jaboticaba												

Figura 9 - Período do ano em que foram observados a presença de larvas de tripetídeos (C. capitata e A. fraterculus) (87).

Conforme Orlando, A. e Sampaio, A.S. (83) o ciclo biológico da C. capitata se enquadra no seguinte esquema, variando de acordo com os frutos mais ou menos próximos da maturação : fazem uma puntura com o ovipositor e logo abaixo da superfície da casca colocam os ovos que se apresentam em grupos de 3-5 e até 15 ou mais. Após a eclosão (2-7 dias) os ovos dão nascimento às larvas que começam a se alimentar da polpa, mudando pelo menos duas vezes de pele (ecdises) aumentando assim de tamanho e provocando uma podridão generalizada. As larvas quando completamente desenvolvidas (6-11 dias) medem de 7 a 8 mm de comprimento; são brancas levemente amareladas e ápodas; tem a parte cefálica fusiforme. Ao atingirem o máximo desenvolvimento, abandonam os frutos e se infiltram no solo a cerca de um centímetro, onde se transformam em pupa daí então emergindo o adulto após 9-11 dias (24, 4°C). O adulto vive em média 60-80 dias podendo atingir até 300 dias. A fêmea pode colocar 500-900 ovos como máximo, sendo 300 o número médio. Apresenta de 6 a 7 gerações anuais.

Recentemente, em 1978 Souza, H.M.L. e outros (97) estudaram a biologia da C. capitata bem como estabeleceram uma dieta artificial para sua produção massal. Os autores sugerem a utilização de controle integrado para se atingir os propósitos de erradicação ou controle da praga, face aos graves inconvenientes advindos do uso do controle químico indiscriminado.

Do ponto de vista médico-sanitário é importante ressaltar a introdução no Brasil de moscas da espécie Chrysomya cujo primeiro registro se deu em dezembro de 1975 em Curitiba com Chrysomya chloropyga (Diptera calliphoridae) e em janeiro de 1978 com C. megacephala e C. albiceps em São Paulo. Pesquisas realizadas por Guimarães, J.H. (51) e colaboradores, no Estado de São Paulo mostram que dentre 139 municípios pesquisados confirmava-se a presença de C. chloropyga em 127 deles, C. albiceps em

77 e C. megacephala em 86. O autor desconhece ainda os reais problemas que poderão ser acarretados ao homem e animais por essas moscas, porém podem ser previstos face a inexistência de inimigos naturais, a grande expansão das cidades envolvendo as áreas suburbanas e a proximidade física dessas comunidades a lixões, abatedouros, etc, focos de proliferação das moscas que competem com vantagem com a Musca domestica.

2.7. INOCUIDADE A VERTEBRADOS

De Barjac e Riou (39) em 1969 verificaram a ação da toxina termo estável de B. thuringiensis var. thuringiensis injetada a camundongos usando a via intraperitonal e a sub cutânea. A toxina purificada conforme de Barjac e Dedonder (37) foi dissolvida em soro fisiológico, ajustado o pH a 7,0 e esterilizado. As doses variaram em progressão geométrica de razão 2 desde 100 µg até 1000 µg. Vinte camundongos foram injetados com cada dose e observados durante quatorze dias. Para as doses de 800 a 1000 µg ocorreram mortalidades elevadas após quarenta e oito horas. Doses médias acarretaram mortalidade variada a partir do décimo quarto dia. Afim de determinar se havia efeito cumulativo, doses médias foram injetadas três vezes por semana durante três semanas. Os exames histológicos realizados sobre todos os órgãos não revelaram nada de anormal. Uma dose de 180 µg para uma rata de 25 g em doses de 20 µg é perfeitamente tolerável. Para determinar o grau de tolerância foram injetados 40 µg de exotoxina por três vezes por semana em três semanas (360 µg). Vinte e nove dias após o tratamento, nada de anormal havia ocorrido com os animais. Com 60 µg por nove vezes (540 µg) ocorreu 20% de mortalidade após o décimo segundo dia do término da aplicação (33º dia). Realizaram testes de ingestão da exotoxina variando de 100 µg a 3,2 mg, em progressão geométrica de razão 2. Até 1,6mg de exotoxina obtiveram após oito dias 0% de mortalidade. Com 3,2 mg obtiveram 40% de mortalidade. Concluíram que é muito grande a tolerância dos ratos à exotoxina sendo menor para aplicação por injeção intraperitonal ou sub cutânea. Para doses fracionadas a tolerância é muito grande à injeção sendo que 360 µg (em nove doses de 40 µg) não acarretam mortalidade e 540 µg (em nove doses de 60 µg) acarretaram 20% de mortalidade no 33º dia. Por ingestão, doses que provocam 80 a 100% de mortalidade por injeção não acarretam nenhuma morte, nem problema.

Em 1970 Rasková e Mask (88) confirmam a não - toxicidade da exotoxina a mamíferos e afirmam ser ela praticamente atóxica a peixes. Segundo os autores a importância da exotoxina é farmacologicamente significativa devido a necessidade de inseticidas inteiramente inócuos a vertebrados, mas extremamente tóxicos a insetos.

Faust (44) em 1973 apresenta considerações a respeito de resultados encontrados por vários pesquisadores. Apresenta valores de dose letal média da exotoxina e de inseticida químico por exemplo, para Musca domestica 1 µg/g da exotoxina contra 10 µg/g de dieldrin; para Galleria mellonella 0,55 µg/g de exotoxina contra 74,2 µg/g de DDT. Os LD50 para Pieris brassicae e Aedes aegypti sendo 6 µg/g e 1,9 µg/g respectivamente para exotoxina. No caso de vertebrados e insetos benéficos os valores de toxicidade, afirmam os autores, são muito limitados. Com abelhas, Cantwell (29) encontrou toxicidade para 300 µg de exotoxina por mililitro de xarope de sacarose, porém para ingestão dessa dose por abelha deveria haver aplicações entre 24 e 865 kg de preparações de B. thuringiensis por hectare, quantidades essas exageradamente elevadas para a prática agrícola. Noutros aspectos, o autor enfoca a aplicação de exotoxina a rações animais para o controle de larvas nas fezes, que não acarreta nenhum problema ao animal. Gingrich (50) afirma a inexistência de toxicidade, tendo usado exotoxina em ração de novilhos; Millar (74) aplicou-a à ração de aves. Briggs (12) ministrando a exotoxina, oralmente, a galinhas reporta não ter havido efeito na quantidade ou qualidade dos ovos das poedeiras assim tratadas.

Ainda em 1973 Ignoffo (60, 61) reafirma a importância dos inseticidas bacterianos em relação aos inseticidas químicos, face aos problemas de toxicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade, apresentando resultados de testes realizados para avaliar a inocuidade dos inseticidas de B. thuringiensis. Prova a inocuidade da endotoxina e refere-se a toxicidade por injeção via peritonal ou sub cutânea ao camun-

dongo ou ao rato. Adverte que a inocuidade do entomopatógeno a vertebrados é relativa. A interpretação dos resultados deve considerar a dose ministrada, como foi ministrada (via oral ou injeção), e que fatores foram considerados para avaliar inocuidade ou toxicidade. Inocuidade absoluta não pode ser garantida em todos os sistemas vivos em todo o tempo. Toxicidade ou patogenicidade podem ser geralmente demonstradas se não se impuserem restrições à dosagem ou tipo de sistema vertebrado. Uma decisão sobre o campo de uso de um entomopatógeno deve ser baseada em uma prudente consideração dos benefícios a serem obtidos em contraposição ao potencial de riscos de uso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microorganismo

Foram empregados duas diferentes variedades de Bacillus thuringiensis.

Bacillus thuringiensis NCIB 9207 recebido da National Collection of Industrial Bacteria, classificada por Norris como sendo variedade dendrolimus sorotipo 4 : 4a, 4c, e denominada Bt A no transcorrer desta pesquisa.

Bacillus thuringiensis var. Berliner sorotipo 1, isolado do padrão de referência recebido do Laboratório de Luta Biológica, do Instituto Pasteur, Paris. Denominado Bt P.

Bacillus thuringiensis var. Berliner sorotipo 1, isolado de amostra de produto comercial e aqui denominado Bt B.

3.2. Insetos-Teste

Foram utilizados os seguintes:

Drosophila melanogaster (Diptera-drosophilidae), criada no laboratório de Bioengenharia (FEA/UNICAMP).

Ceratitis capitata (Diptera-Trypetidae) criada no Laboratório de Genética de Populações de Moscas de Frutas, do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Musca domestica (Diptera-Muscidae), Chrysomya chloropyga (Diptera-Calliphoridae) e Chrysomya megacephala (Diptera-Calliphoridae) criados no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.3. Descrição dos Equipamentos Principais

3.3.1. Agitador-incubador rotativo

Para o preparo dos inóculos e pré fermentações foi utilizado o agitador-incubador rotativo com as seguin

tes características:

Denominação e Procedência: Psycrotherm da N. Brunswick Scientific Co. Inc.

Modelo G-27

Velocidade 40 - 400 rpm (± 5)

Passo: 2,54 cm

Temperatura: 0°C a 60°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)

Plataformas para tubos e frascos com capacidades desde 125 ml até 2000 ml.

3.3.2. Mini fermentador

Foi utilizado o modelo M 1000 da Fermentation Design, cujo esquema se apresenta no anexo I, com as seguintes características:

a) Vaso de fermentação de vidro pirex de 1000 ml com volume útil de 800 ml.

b) Agitador magnético recoberto de teflon com velocidade variável entre 300 e 690 rpm.

c) Aeração através de compressor (ou mini bomba), medida sua vazão em rotâmetro calibrado em l/min (1 atm e 21,1°C).

d) Filtro de ar: cilindro de polipropileno recheado de lã de vidro.

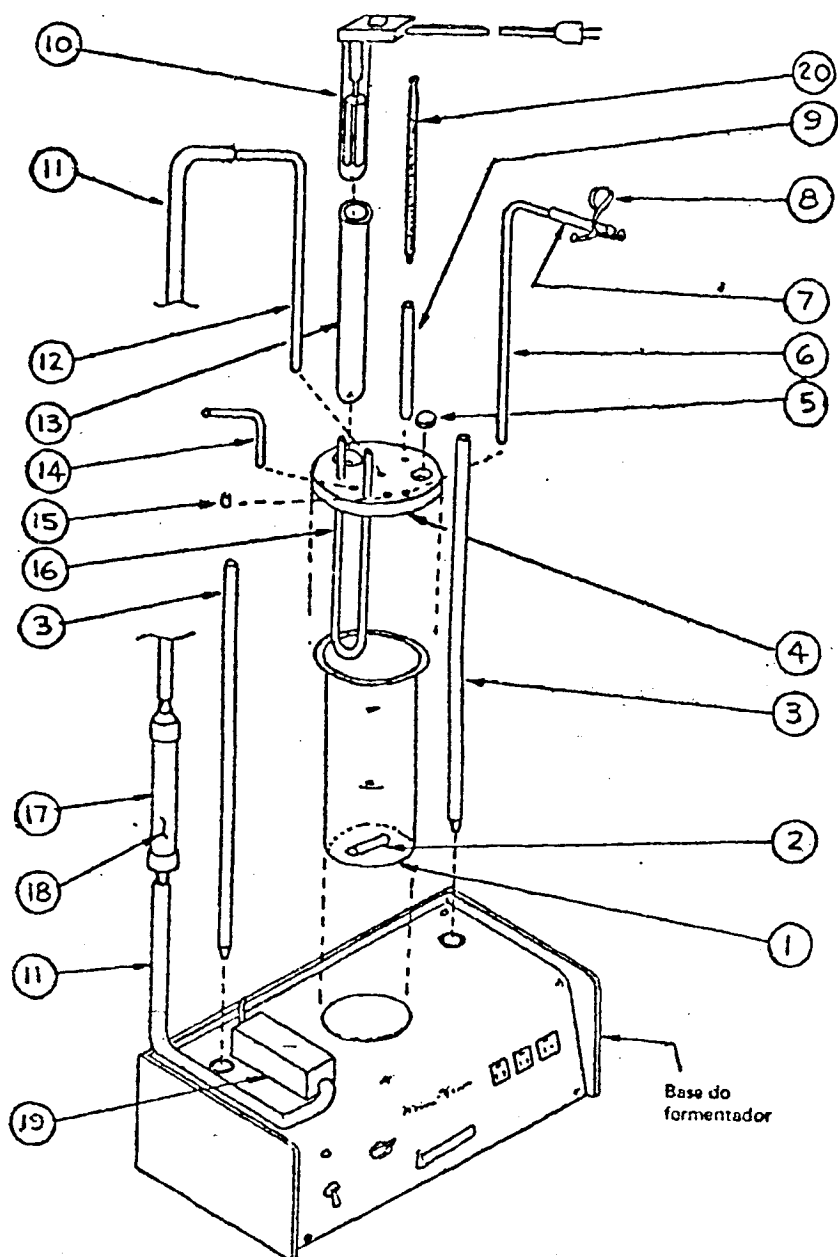
e) Temperatura mantida de 0°C a 60°C com precisão de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ através de termostato e/ou água refrigerada.

f) Eletrodo de oxigênio da Fermentation Design modelo E 100.

g) Analisador-Registrador de Oxigênio Dissolvido da Fermentation Design, modelo DOAR.

h) Autoclave Steroclave 25 X da Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc. destinada a esterilização do Mini fermentador, seu conteúdo e componentes.

ESQUEMA DO MINIFERMENTADOR



- | | |
|--|--|
| 1) Vaso pirex (1000 ml) | 11) Mangueira de entrada de ar |
| 2) Agitador magnético | 12) Tubo inox de entrada de ar |
| 3) Suportes (2) | 13) Tubo pirex do aquecedor |
| 4) Tampa | 14) Linha de saída do ar |
| 5) Diafragma de borracha para introdução de seringas:
Inoculação, controles de pH e espuma. | 15) Orifício para eletrodo de oxigênio |
| 6) Tubo inox para retirada de amostra | 16) Tubo inox em "U" para resfriamento |
| 7) Mangueira terminal | 17) Filtro de ar |
| 8) Presilha da mangueira | 18) Meio filtrante (lã de vidro) |
| 9) Falso pirex para o termômetro | 19) Bomba de ar ou compressor |
| 10) Aquecedor | 20) Termômetro |

3.3.3. Fermentador de 20 litros

Foi utilizada uma unidade de fermentação CHEMAP modelo F 0020. A capacidade do tanque é de 20 litros e o volume de operação (neste trabalho) foi de 11 litros de meio de cultura. Todas as partes em contato com o meio de cultura e/ou reagentes são construídas de aço inoxidável 316 L.

Apresenta as seguintes características:

a) Tanque

No Anexo II apresenta-se o esquema do fermentador e suas dimensões principais cujas relações se apresentam a seguir:

Diametro do tanque $T = 0,240 \text{ m}$

$D/T = 0,322$; $H_T/T = 2,03$ $H_L/T = 1,0$;

$H_1/T = 0,288$; $H_2/T = 0,625$ $H_A/T = 0,083$

$W_b/T = 0,0825$; $L/D = 0,242$; $W/D = 0,309$

b) Agitação

O sistema de agitação é constituído por duas turbinas de disco de seis pás montadas sobre o eixo e quatro defletores (ou chicanas) junto a parede (diametralmente opostos). O eixo de agitação é montado no tanque mediante um selo "Crane" inferior e uma bucha superior de teflon grafitado. Os agitadores são acionados por um motor de corrente contínua, cujo controle eletrônico de velocidade permite variar entre 100 e 1000 rpm.

c) Aeração

O ar se distribui no fermentador através de um anel contendo 15 orifícios de 1,4 mm de diâmetro, sendo esterilizado à entrada e à saída do fermentador atra-

ANEXO II

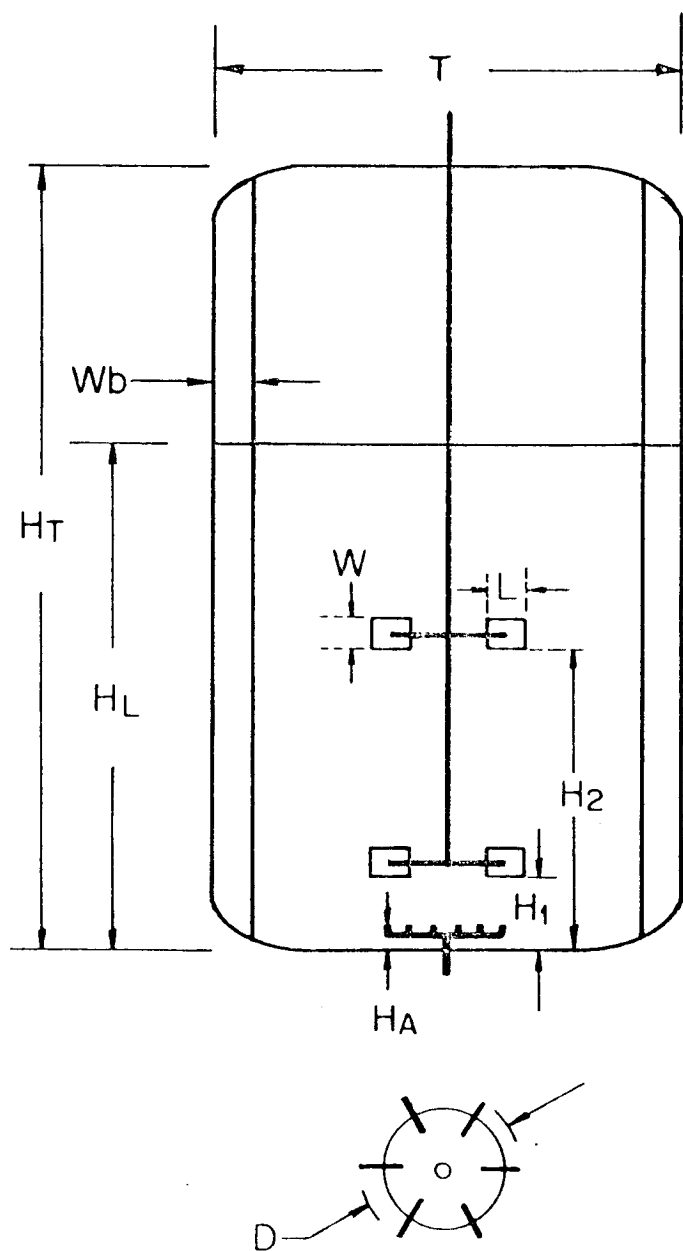


Diagrama de Fermentador de 20 litros

vés de filtros de porcelana porosa. O medidor de vazão é um rotâmetro Brooks tipo 1355 - 10A - 1BAB, sendo a pressão do ar controlada através de uma válvula redutora de pressão.

Para medida da concentração de oxigênio dissolvido no fermentador é acoplado um Analisador registrador de oxigênio da Beckman modelo 777, tipo polarográfico.

d) Temperatura

O elemento sensor é um termômetro de resistência de platina; o sistema controlador é com re-alimentação, marca Hartmann Braun, atuando sobre a admissão alternada de água de resfriamento e água aquecida por reostatos de imersão na camisa do tanque.

e) Controle de pH

O elemento sensor é um eletrodo de pH combinado Ingold, esterilizável, cuja leitura se obtém através do amplificador de tensão Methron-herisau modelo E-450, acoplado a um controlador eletrônico de pulso Methron-herisau modelo E-470. O controlador opera uma bomba peristáltica Hiloflow da Metering Pumps Ltd, de vazão ajustável.

3.4. Listagem dos Equipamentos Auxiliares

- Espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch and Lomb (faixa visível).
- Espectrofotômetro da Perkin Elmer para UV.
- Balanças de Precisão Mettler modelo P 160N (max 160 g div 1 mg) com lâmpada infra vermelha para secagem e modelo P1000 (max 1000 g com divisão de 1 g).
- Esterilizador Fabbe modelo 104 (max 3 Kg/cm²).
- Estufa Fanem para secagem com painel frontal e termostato, graduada desde a temperatura ambiente até 60°C com sistema de convecção de ar forçada no sentido horizontal.

- Centrífuga Fanem modelo 209-NR.
- Potenciômetro pH meter Horiba H-5 com ajuste automático de temperatura e precisão de $\pm 0,05$ unidades de pH.
- Microscópicos Carl Zeiss e de contraste de fase Nikon modelo L-Ke.
- Atomizador de partículas (Spray drier) da "Niro atomizer".
- Liofilizador da Virtz.
- Equipamento de Filtração Sartorius de Membrana, com funil graduado.
- Equipamento para evaporação: Evaporador rotativo a vácuo Rotavapor RE/A-RSB/A-W-240 K com sistema de regulação eletrônica. Motor de indução blindado, rotação contínua regulável eletronicamente desde 20 a 220 rpm. Evaporação a pressão normal e vácuo até menos de 1 torr.
- Espectrógrafo de massa da Varian.

3.5. Outros Materiais

- Exotoxina termo estável, padrão de referência obtida do Instituto Pasteur, Laboratório de Luta Biológica (Dr. H. de Barjac).
- Reagentes P.A.
- Vidraria de laboratório.
- Melaço e água de maceração de milho
- Fubá
- Talco industrial.

3.6. Procedimento Experimental

Realizaram-se fermentações em frascos agitados, em Mini fermentador e no Fermentador Chemap.

3.6.1. Composição dos meios de cultura

Para manutenção do microrganismo foi empregado o seguinte meio de cultura:

Composição	g/l
Extrato de carne	1
Extrato de levedura	2
Peptona	5
Cloreto de sódio	5
Agar	15
pH ajustado a	7,3

Os tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo cada um aproximadamente 12 ml de meio de cultura, foram esterilizados a 121°C por 15 minutos, esfriados e inclinados para posterior inoculação ou repique do microrganismo em estudo. Inoculados foram levados a incubador a 30°C por 48 - 72 h e a manutenção posterior se deu em geladeira a 5°C $\pm$ 2°C. As repicagens foram efetuadas a cada 30 dias.

Para semear o minifermentador foi utilizado meio de cultura de pré-fermentação diferente daquele de produção.

Composição	g/l
Na ₂ HPO ₄	2,5
Na Cl	5,0
Glicose	2,0
Triptose	20,0
H ₂ O até 1000 ml	
pH ajustado a	7,3

Cinquenta mililitros de meio de cultura líquido colocados em frascos erlenmeyer de 500 ml foram esterilizados por 15 minutos a 121°C. Esfriados a 30°C foram inoculados com o microrganismo em estudo e levados ao agitador incubador rotativo. Foram realizadas duas pré-fermentações a 30°C, 200 rpm e com duração de 12 e 8 horas, respectivamente.

Os meios de cultura para fermentação foram:

Componente (g/l)	Meio de fermentação	
	1	2
Melaço	15	10
AMM	60	40
água até 1 litro		
pH ajustado a 7,3		

3.6.2. Preparo e esterilização do meio de cultura nas duas escalas.

3.6.2.1. Em mini fermentador

Setecentos e sessenta mililitros (760 ml) de meio de cultura foram introduzidos ao mini fermentador, que foi tampado e teve suas conexões protegidas com algodão e folha de papel alumínio. O conjunto e acessórios foram levados a autoclave própria, onde foram aquecidos a 121°C , mantidos por 15 minutos na mesma temperatura e resfriados a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (temperatura de inoculação).

3.6.2.2. No fermentador Chemap

O volume de 10,450 l de meio de cultura foi colocado no tanque de fermentação, cujo aquecimento processou-se por circulação de vapor saturado através da camisa até 121°C . Essa temperatura foi mantida por 20 minutos com agitação contínua a 150 rpm, sendo posteriormente resfriado o conjunto pela circulação de água fria através da camisa do tanque até atingir a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.6.3. Preparo da semente

Para o mini fermentador a semente foi obtida da segunda pré-fermentação conforme descrita no item 3.6.1.

Fração do mosto contendo os microrganismos em fase exponencial de crescimento, foi transferida assépticamente ao mini-fermentador devidamente estéril (conforme 3.6.2.1). Usaram-se 40 ml de mosto completando-se assim os 800 ml de volume de trabalho (5% V/V).

Para o fermentador Chemap contendo o meio de cultura estéril foram aseticamente transferidos 550 ml de mosto com 8 horas de fermentação em Mini-fermentador (final da fase exponencial) completaram-se assim os 11 litros de volume de trabalho (5,0% V/V).

3.6.4. Condições de operação

No mini-fermentador empregou-se agitação de 380 rpm, aeração de 1,0 vvm e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

No fermentador Chemap as condições foram: agitação de 500 rpm, aeração de 0,5 vvm e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.7. Métodos Analíticos

Durante e após a fermentação foi realizada de terminação do consumo de açúcar, comportamento do pH, concentração de ácido dipicolínico, concentração celular (através de leituras de absorbância ou determinação de massa seca a 105°C) e concentração de oxigênio dissolvido.

A análise de açúcar (expresso como glicose) foi realizada consoante metodologia de dosagem colorimétrica usando-se o reagente antrona (Biochemistry laboratory technique, J. Wiley, Ed. N. York, 1966).

O comportamento do pH foi verificado através de determinações potenciométricas.

A concentração de ácido dipicolínico (DPA) foi realizada colorimetricamente pelo método de Jansen (Science 127 : 26-7, 1958) e para a correlação entre a

concentração de DPA e o número de esporos viáveis empregou-se a curva de Fisher (45).

A concentração celular foi obtida em relação à absorvância (550 nm) para acompanhamento do crescimento celular e determinação da velocidade específica de crescimento.

A determinação da concentração de oxigênio dissolvido se fez utilizando o analisador registrador Beckman. Também foi determinada a taxa de respiração, através dessa leitura e do balanço de oxigênio em todo o fermentador.

A análise química qualitativa do produto liofilizado foi realizada no Instituto de Química, através do espectrógrafo de massa Varian.

3.8. Separação das toxinas obtidas

Durante e após a fermentação foram retiradas alíquotas do mosto, centrifugadas para separar as endotoxinas. As primeiras permaneceram no material cremoso (junto com a massa celular) e as últimas permaneceram na fase líquida.

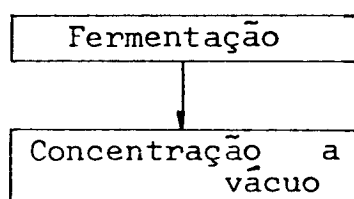
O líquido foi submetido a tratamento térmico a fim de que apenas as exotoxinas termo estáveis pudessem ser estudadas.

3.9. Metodologia de concentração da exotoxina termo estável

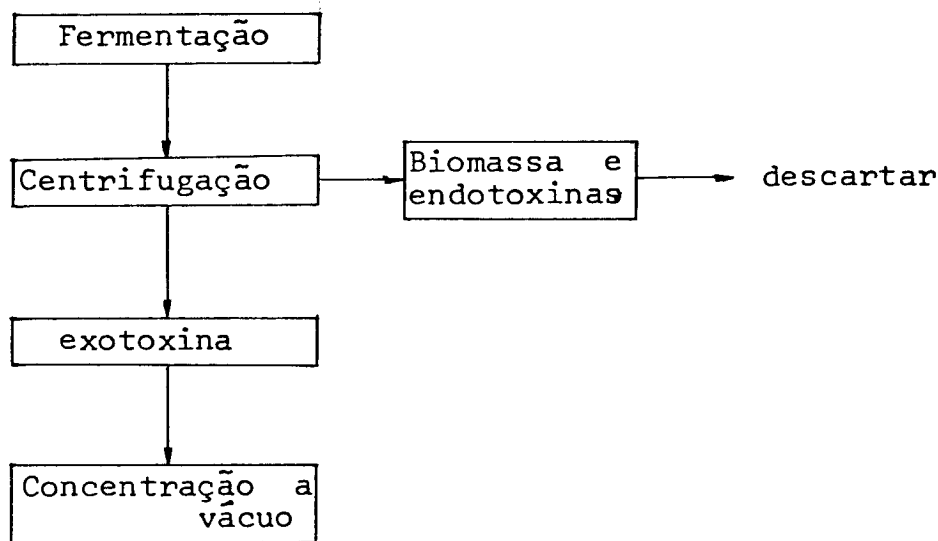
Foram utilizados os seguintes fluxogramas:

3.9.1. Para concentração

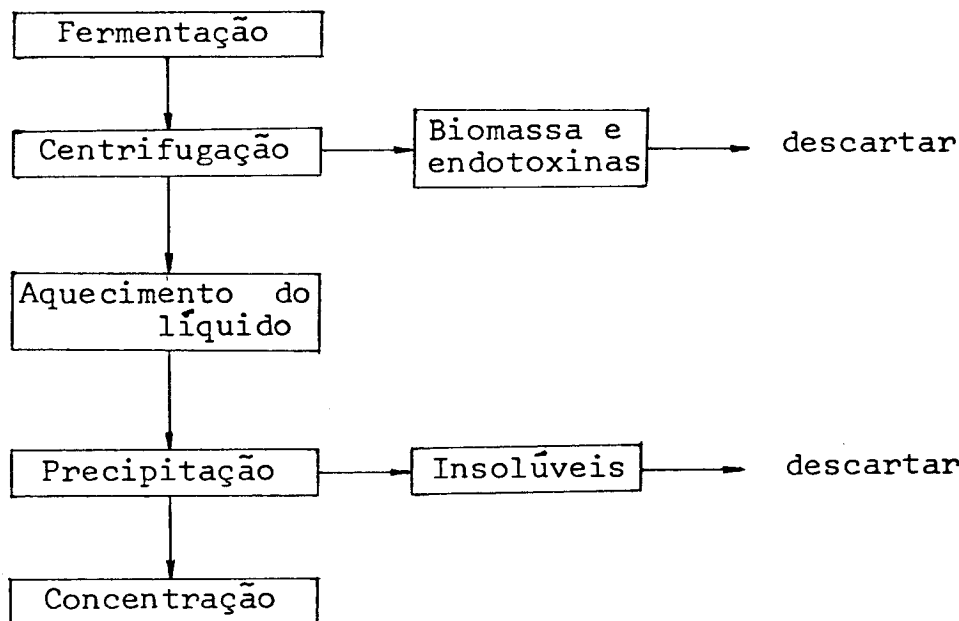
Fluxograma 1:



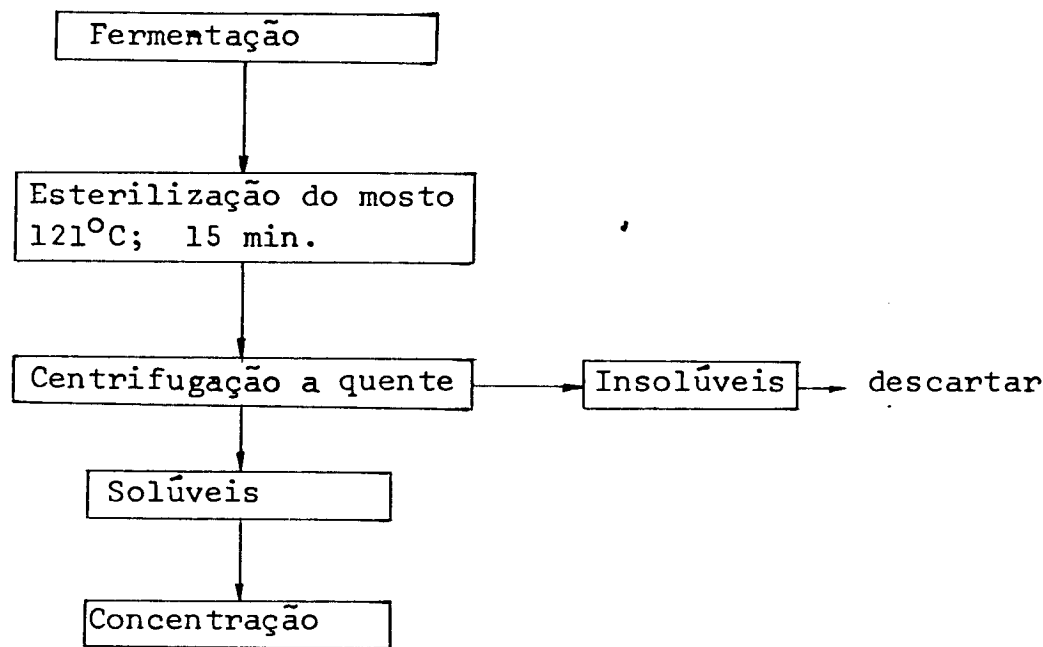
Fluxograma 2:



Fluxograma 3:

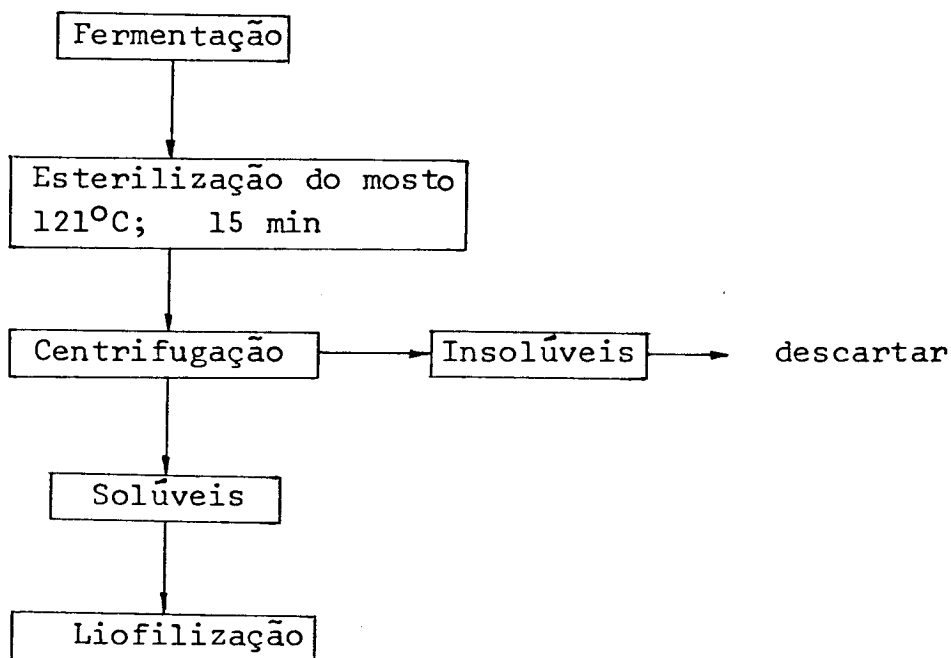


Fluxograma 4:



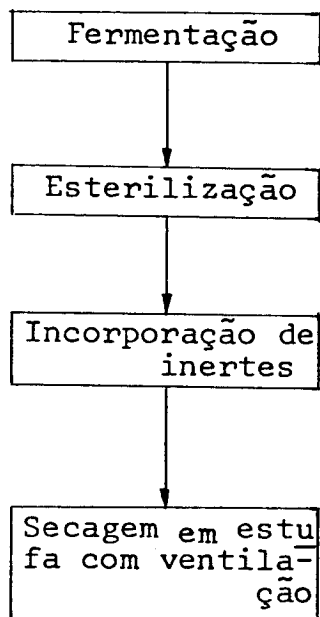
3.9.2. Para liofilização

Fluxograma 5:



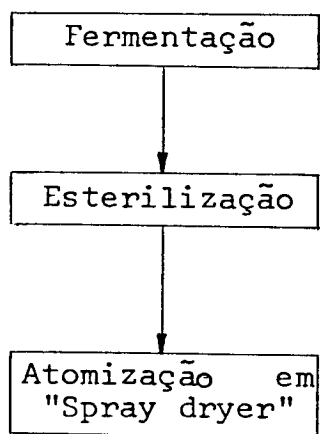
3.9.3. Por adição de inertes (fubã ou talco industrial)

Fluxograma 6:



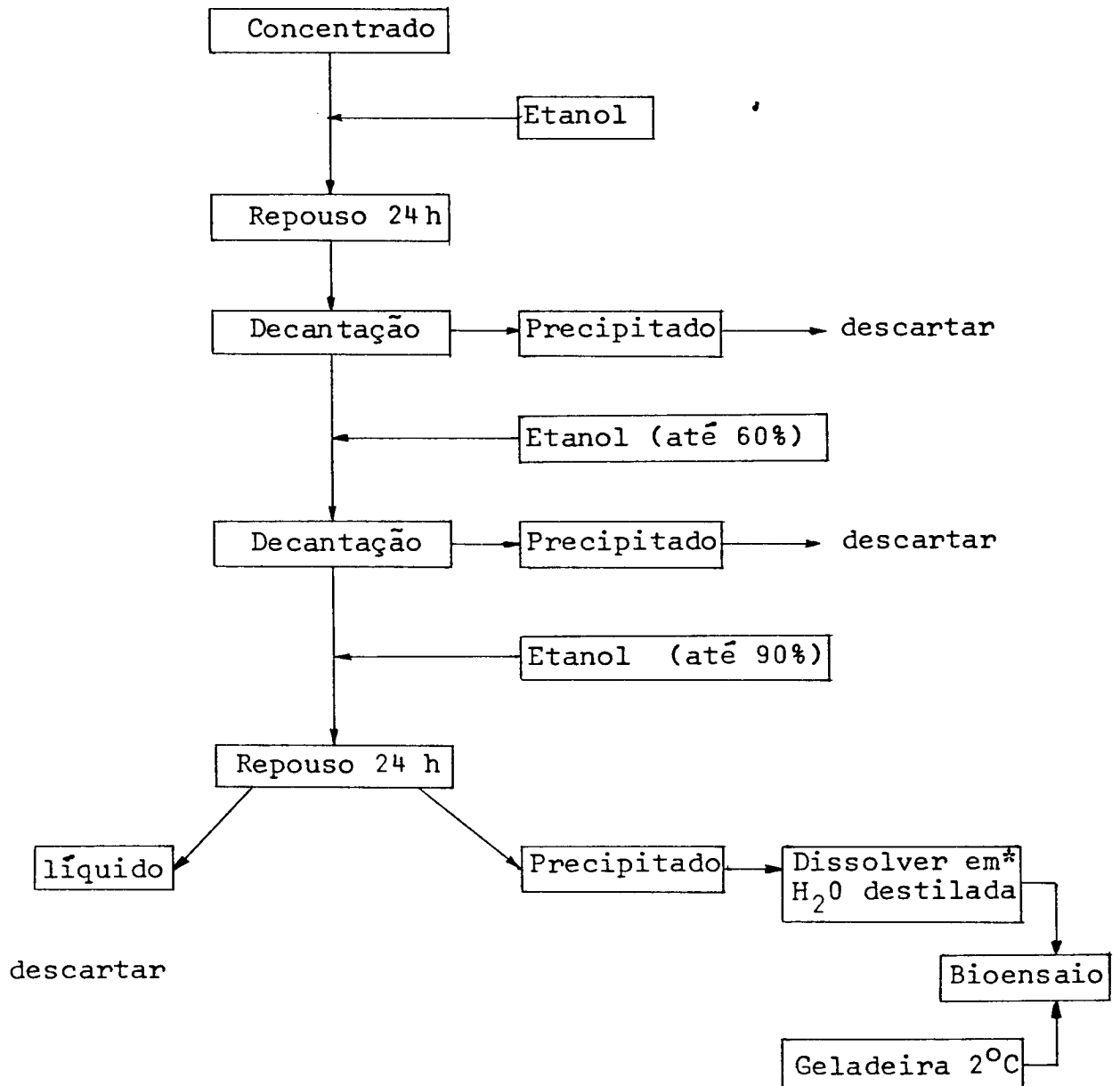
3.9.4. Por atomização em "spray dryer"

Fluxograma 7:



3.10. Metodologia de semi purificação

Realizada conforme o fluxograma 8 a seguir:



*Exotoxina termo estável pré purificada

3.11. Metodologia de Purificação

A toxina semi purificada conforme item 3.10. foi tratada da seguinte maneira:

20 ml foram misturados a celulose em pó até formar uma pasta espessa à qual se adicionou 80 ml de etanol.

Introduziu-se a mistura pelo topo de uma coluna de 20 cm de altura e 10 cm de diâmetro e eluiu-se com uma solução de etanol a 80% até que o eluido tornou-se incolor.

As frações obtidas foram testadas contra o inseto-teste (Drosophila melanogaster)

Eluiu-se então a coluna com solução de etanol a 75%. As 15 frações de 200 ml retiradas foram levadas ao bio ensaio e ao espectrofotômetro da Perkin Elmer para determinação do máximo e mínimo de absorção ao ultravioleta.

3.12. Caracterização qualitativa da exotoxina termo estável

Amostras da exotoxina obtidas por liofilização foram analisadas em espectrógrafo de massa da Varian afim de se determinar o peso molecular aproximado e comparar espectros com o espectro da exotoxina padrão. Essa análise foi desenvolvida no Instituto de Química da UNICAMP.

3.13. Bioensaios

3.13.1. Para Drosophila melanogaster

As moscas obtidas em laboratório, sobre cascas de bananas maduras, foram testadas para verificação da atividade tóxica das frações purificadas conforme o item 3.11. Este foi um teste realizado apenas para constatação e não para quantificação do teor da exotoxina.

Foi preparada uma dieta contendo fubá gelatinizado ao qual se acrescenta a fração purificada, em estudo.

Os copos contendo a dieta, receberam 10 ovos de Drosophila, foram recobertos com filme de polietileno perfurado e mantidos a 24 - 25°C e 80% de umidade relativa. As moscas emergentes foram contadas. O lote testemunha não continha a fração de exotoxina na dieta.

3.13.2. Para Ceratitis capitata

As moscas obtidas no laboratório de genética das populações do Instituto de Biologia da UNICAMP foram testadas para verificar a suscetibilidade à exotoxina, pela larva, ovo, pupa e adulto. A exotoxina testada foi obtida conforme o item 3.9.1.

Foram utilizadas dietas sólidas (geis de fubá) para o ovo e a pupa, e cenoura ralada para a larva e o adulto tendo sido o bioensaio desenvolvido e realizado no Instituto de Biologia a cargo da Dra. Hebe M.L. de Souza.

Cada ensaio de suscetibilidade do ovo à toxina foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura, 100 ovos e 1ml da solução teste. Foram incubados com temperatura e umidade controlada.

O teste com pupas utilizou 100 pupas e 1 ml da solução teste foi aspergido sobre as mesmas. Foram incubadas em condições de umidade e temperatura controladas. Também no teste de larvas foram usadas 100 larvas de 5 dias em cada ensaio.

Um mililitro da solução teste foi utilizado em cada ensaio e as caixas contendo o meio de cultura e a toxina, bem como a caixa controle foram colocadas em incubador a temperatura e umidade controladas.

O teste com insetos adultos empregou 50 adultos machos e 50 fêmeas. Um mililitro de solução teste

foi colocada em uma placa recoberta com tela para que o adulto pudesse ingerí-la.

A caixa contendo os insetos adultos, recoberta com tela foi mantida em ambiente com temperatura e umidade controladas. Foi verificada a mortalidade diária para determinação da taxa de mortalidade média para concentração estudada.

3.13.3. Para Musca domestica, Chrysomya chloropyga e C. megacephala foi aplicado o bioensaio quantitativo, conforme Bond e outros (10)

Copos de plástico (de 250 ml de capacidade) transparentes, receberam diferentes concentrações de inseticida semi-purificado conforme item 3.10., diluído em leite. Em nossos ensaios não introduzimos extrato de levedura.

Papel de filtro foi introduzido para absorver o excesso de líquido.

Vinte larvas de moscas (neonatas) foram introduzidas e o copo recoberto com filme de polietileno perfurado para assegurar transferência de oxigênio ao inseto e de gases ao exterior.

Após incubação a 30°C por 7 ou 15 dias (conforme Musca ou chrysomya) foi verificado o número de moscas emergentes afim de calcular a concentração letal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processo Fermentativo: transcorreu similarmente para os tres microrganismos estudados BtA, BtP e BtB.

4.1.1. Comportamento do pH

As fermentações realizadas em mini-fermentador apresentaram o mesmo comportamento padrão já observado em nossos trabalhos anteriores (75, 77); isto é, a variação do pH ocorre com um decréscimo do valor inicial 7,3 até valores na faixa de 5,0 a 5,5 dentro das dez pri^{me}meiras horas de fermentação; segue-se uma fase de valor estacionário de pH que dura entre 5 e 10 horas após o que há um retorno à neutralidade por volta das 24 até 30 horas de fermentação, quando se completa a esporulação do microrganismo.

A figura 4.1 ilustra esse comportamento, bem como o ocorrido no Fermentador CHEMAP.

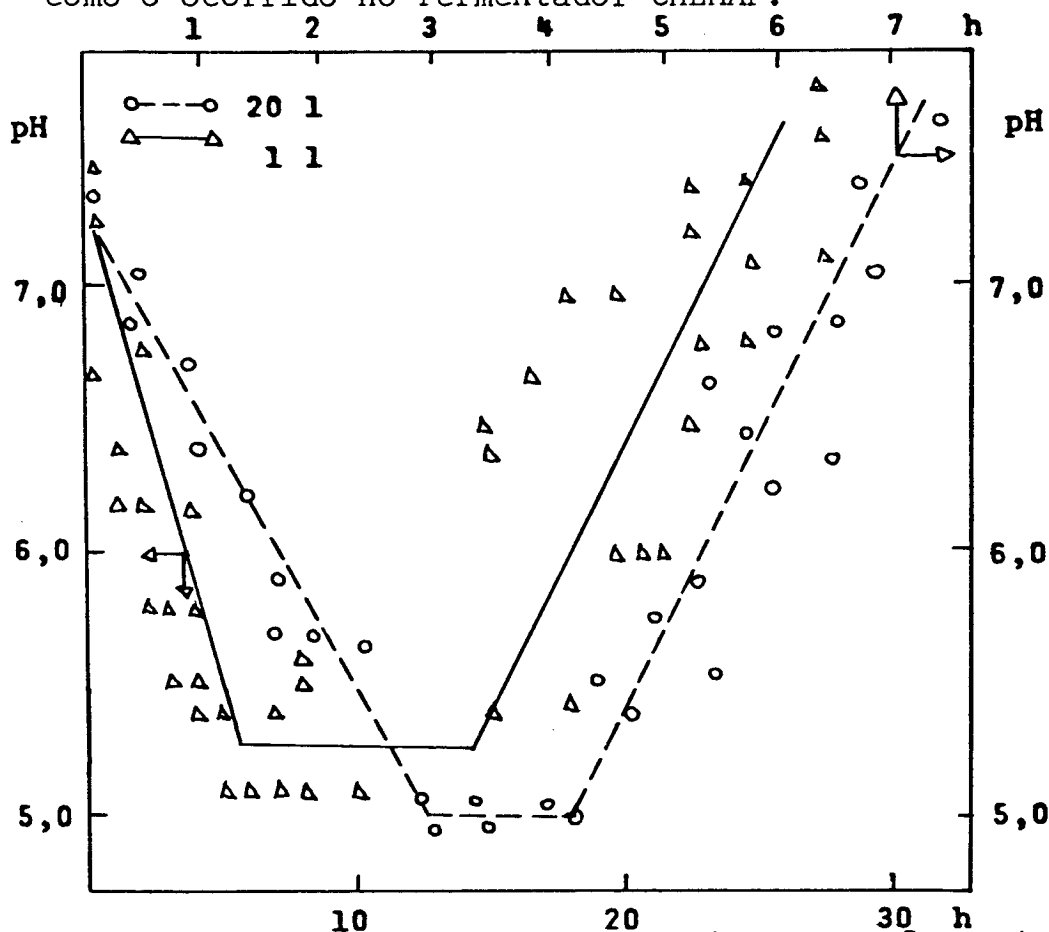


Figura 4.1 - Comportamento do pH durante a fermentação
(Δ) Mini-fermentador, (o) Fermentador 20 l.

Comportamento similar ocorreu no fermentador Chemap (escala maior), porém os tempos transcorridos entre as fases foram muito menores. Assim tivemos o decréscimo do pH de 7,3 ao seu mínimo valor 4,7 entre 3,5 a 4,5 horas. Entre a fase estacionária do valor de pH e seu retorno à neutralidade transcorreram de 2 a 2,5 horas tendo então o pH atingido valores de 7,0 a 7,5. As fermentações nesta escala tiveram duração total de 5,5 a 7 horas enquanto que em escala menor, duraram entre 24 e 30 horas. Valores de literatura apresentam duração total superior a 36 horas (95).

- 4.1.2. Consumo de açúcar: foi determinado pelo método colorimétrico (3.7), sendo os açúcares expressos como glicose.

A velocidade de consumo de açúcar em mini-fermentador foi tal que dentro das primeiras dez horas de fermentação, o teor de açúcar no mosto havia decrescido a 10% do seu valor inicial.

No fermentador Chemap, 90% do açúcar inicial foi consumido dentro das 5 primeiras horas de fermentação. A figura 4.2 ilustra esse comportamento.

- 4.1.3. Influência da concentração de oxigênio dissolvido durante a fermentação

Foram testadas diferentes concentrações de oxigênio dissolvido durante a fermentação afim de determinar sua influência na velocidade específica de crescimento do microrganismo. Foi determinado o valor da taxa de respiração através de balanço de oxigênio no fermentador, obtendo-se a leitura no analisador-registrador Beckman (quando usando o Fermentador Chemap) ou DOAR da Fermentation Design (quando usando o mini-fermentador).

Os resultados encontrados para as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido estudados são apre

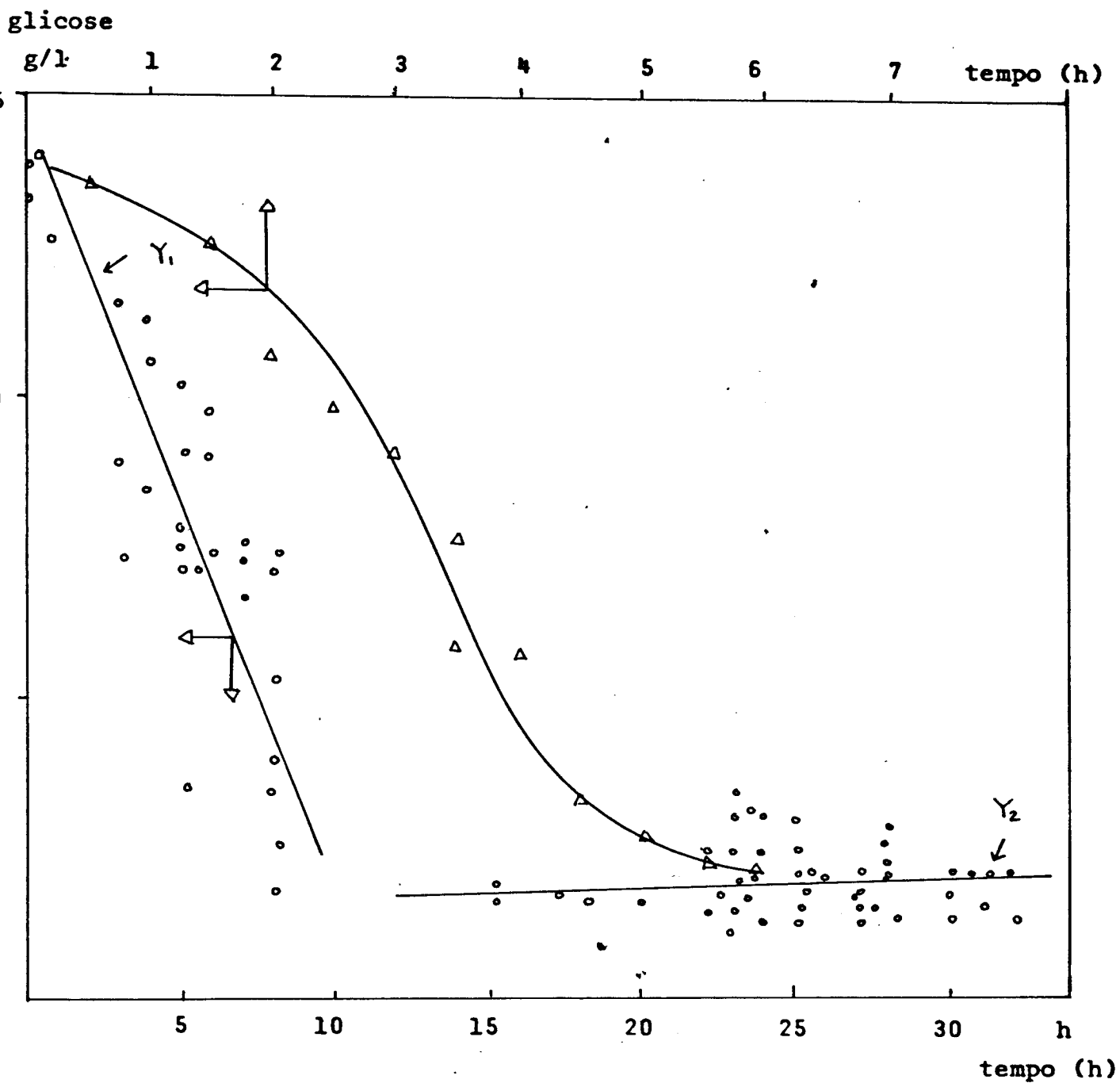


Figura 4.2 - Cinética do consumo de açúcar nas duas escalas (o) Mini-fermentador; (Δ) Fermentador de 20 l.

sentados no Quadro 4.1.

Quadro 4.1. Comportamento da taxa de respiração e velocidade específica de crescimento de B. thuringiensis em Fermentador Chemap, com a concentração de Oxigênio dissolvido.

$\frac{C_s}{C^*} \cdot 10^2$	$C_s \cdot 10^{-2}$ m mol/l	R m mol/h.g	μ h^{-1}
2,5	0,609	8,88	0,35
4,0	0,975	10,11	0,44
6,2	1,511	10,99	0,54
10,0	2,438	13,04	0,62
12,0	2,925	12,86	0,57
17,5	4,266	11,38	0,52
20,0	4,875	10,96	0,45

Observa-se que o melhor valor para a máxima velocidade específica de crescimento $0,62 \text{ h}^{-1}$ que corresponde à maior taxa de respiração ($13,04 \text{ m mol O}_2/\text{h.g}$) é obtida a valores de concentração de oxigênio dissolvido no entorno de 10% do valor de saturação. Concentrações superiores acarretam uma diminuição nesses valores com consequente atraso na fermentação e queda de produtividade.

Nosso trabalho com Santana (91) enfoca os diversos parâmetros e variáveis que influenciam a fermentação de B. thuringiensis; os resultados obtidos permitem estabelecer condições operacionais e projetar fermentadores para a produção industrial de inseticida bacteriano, especialmente para a endotoxina ou complexo esporo-cristal.

4.1.4. Variação da concentração de ácido dipicolínico durante a fermentação

Em fermentador de 20 litros a concentração de DPA determinada conforme metodologia de Jansen (item 3.7) apresenta o comportamento ilustrado na figura 4.3 onde também são apresentados a velocidade de consumo de açúcares e a curva de crescimento do Bacillus thuringiensis (no meio de cultura 1, item 3.6.1). Observa-se que a concentração de DPA diminui nas primeiras horas de fermentação e passa a aumentar a medida que se desenvolve a fase exponencial de crescimento do microrganismo atingindo seu máximo valor paralelamente à fase estacionária de crescimento onde se dá a máxima esporulação. A concentração de DPA é correlacionada à esporulação do microrganismo através da curva apresentada por Fisher (45).

4.2. Separação e recuperação das exotoxinas

4.2.1. Processo fermentativo em mini-fermentador

Após o término da fermentação, o mosto foi tratado a fim de se obterem as toxinas termo estáveis inativando as frações termo lábeis, com ou sem separação das mesmas.

A utilização dos fluxogramas 1, 2, 3, 4, resultou nas concentrações finais que se apresentam no Quadro 4.2.

Os produtos obtidos pelo fluxograma 1 apresentavam uma grande quantidade de componentes atóxicos, dificultando a semi purificação realizada a seguir.

Os produtos obtidos pelo fluxograma 2 continham insolúveis que passavam a fazer parte do concentrado e não possuíam toxicidade, dificultavam o processo de concentração do produto, causando principalmente espuma (pela presença de resíduos infermentecíveis de melaço e água de maceração de milho no mosto).

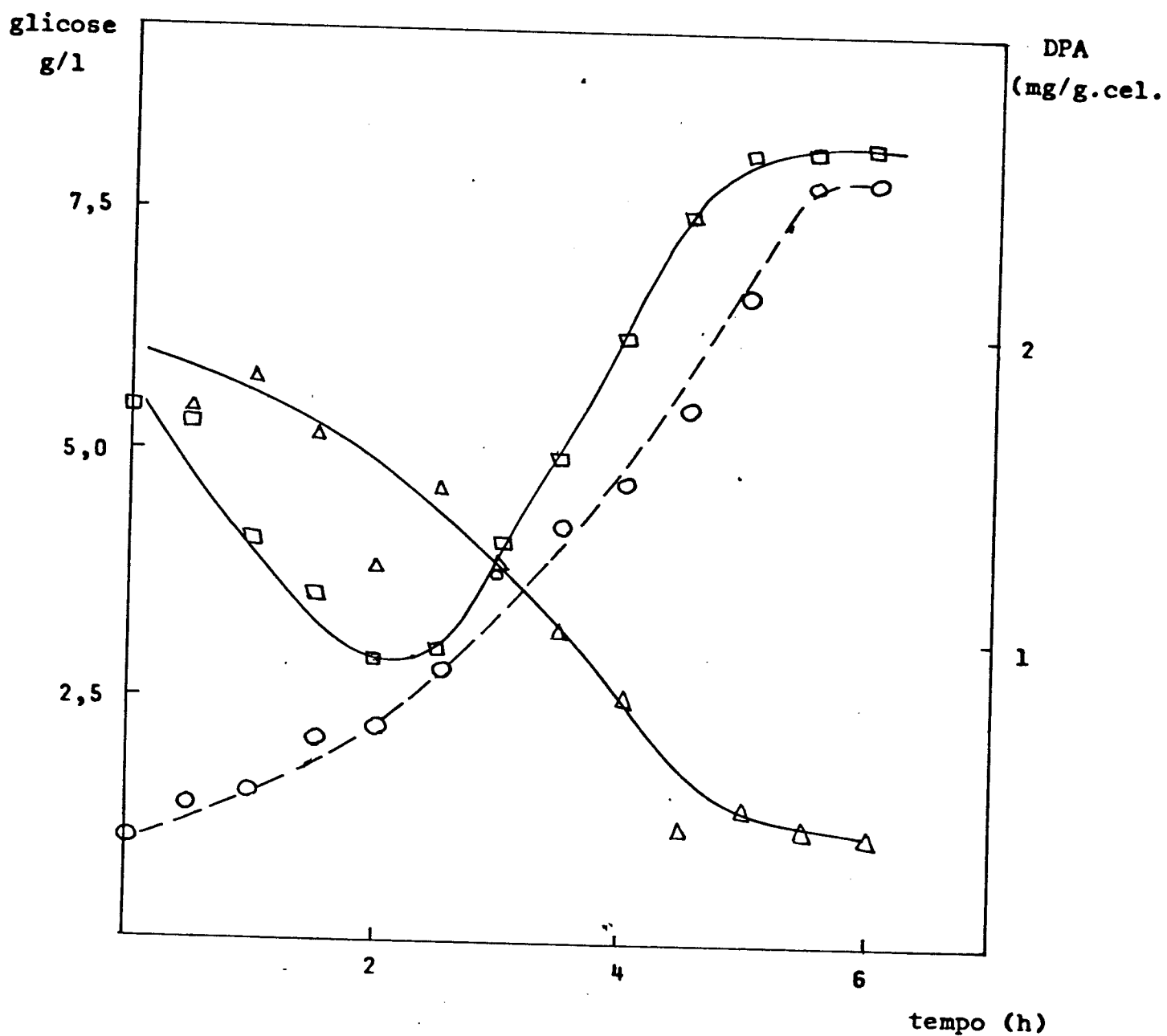


Figura 4.3 - Cinética do crescimento do *E. thuringiensis* (o); consumo de açúcar (Δ); Variação da concentração de ácido dipicolínico DPA ($\square$) durante a fermentação.

Quadro 4.2

Experimento	Microrganismo	meio de cultura	Volume inicial ml	Volume final ml	Fluxo grama (3.9)
I	Bt A	2	450	103	1
II	Bt A	2	485	185	1
III	Bt A	2	455	125	1
IV	Bt B	1	200	40	2
V	Bt P	1	340	70	2
VI	Bt A	2	415	35	2
VII	Bt A	2	410	38	2
VIII	Bt A	2	425	35	3
IX	Bt A	2	395	42	3
X	Bt B	1	370	15	4
XI	Bt B	1	360	20	4
XII	Bt P	2	390	13	4
XIII	Bt P	2	300	13	4

A partir do fluxograma 3 os produtos concentrados após centrifugação com aquecimento do líquido para precipitação e descarte dos insolúveis, ficam livres de boa parte de material atóxico, e no fluxograma 4 a esterilização realizada logo após terminada a fermentação se seguida de centrifugação a quente garantiam a obtenção de exotoxinas termo estáveis facilitando sobremaneira a concentração até produto final.

O quadro 4.3 apresenta os experimentos cujos mostos foram tratados por quatro processos diferentes a fim de obter uma análise mais completa.

Nestes experimentos o mosto de cada fermentação foi dividido em alíquotas e tratadas com o fluxograma escolhido. Assim foram concentrados pelo fluxograma 4 (Experimentos XIV a XVI) e posteriormente foram semi purificadas alíquotas dos concentrados pelo fluxograma 8, resultando produtos que dissolvidos em água destilada foram levados a bioensaio (item 4.4).

Quadro 4.3

Experimento	Microrganismo	meio de cultura	Volume inicial ml	Volume final ml	Fluxograma
XIV	Bt A	2	120	30	4-8
XV	Bt B	1	110	17	4-8
XVI	Bt P	1	110	20	4-8
XVII	Bt A	2	100		5
XVIII	Bt B	1	100		5
XIX	Bt P	1	100		5
XX	Bt A	2			6
XXI	Bt B	1			6
XXII	Bt P	1			6

Os experimentos XVII a XIX forneceram produtos liofi-
lizados cujas massas correspondentes a 100 ml de mosto, resul-
taram 1,1g; 1,2g e 1,4g respectivamente. Posteriormente, uma
amostra de cada produto liofilizado foi levado ao espectrógra-
fo de massa Varian do Instituto de Química a fim de ser carac-
terizado qualitativamente o produto obtido, para uma tentativa
de determinação do seu peso molecular. (item 4.3). Os experi-
mentos de Kim e Huang (64) com liofilização após purificação
resultaram em 42,5 mg/l.

Nos experimentos XX a XXII após a esterilização do
mosto foram incorporados inertes, tendo se estudado incorpora-
ções de 1 ml a 5 ml; a 2g de fubá. Este composto após secagem
foi adicionado para complementação de ração animal, a fim de
controlar insetos em estábulos, pocilgas ou galinheiros. A
exotoxina passando inalterada pelo trato intestinal dos ani-
mais vertebrados vai exercer controle impedindo o desenvolvi-
mento de larvas (ovos ou pupas) de insetos sobre as fezes
dos animais alimentados com a ração tratada. Estas amostras
foram ensaiadas no Centro Nacional de Pesquisas em Suínos e
Aves em rações para suínos, tendo sido analisada sensorial-
mente a carne após abate, para constatação de inexistência de

efeito organolético.

O tratamento do mosto por concentração pelo fluxograma 4 seguido do fluxograma 8, de semi purificação, resultou nos valores de massa de produto semi-purificado que se apresentam no Quadro 4.4:

Experimento	Microrganismo	Volume inicial ml	Massa final g/l	Fluxograma
XXIII	Bt B	300	3,46	8
XXIV	Bt B	230	1,90	8
XXV	Bt P	350	4,05	8
XXVI	Bt P	400	4,03	8
XXVII	Bt A	350	2,75	8

Foi realizada a purificação (item 3.11) dos produtos semi-purificados pelo fluxograma 8 e as frações finais foram ensaiadas contra Drosophila para constatação da toxicidade (item 4.4)

4.2.2. Em fermentador de 20 litros

O mosto fermentado (11 litros) em fermentador Chemap, foi tratado pelo emprego dos diferentes fluxogramas.

O Quadro 4.5. apresenta os resultados obtidos para as frações tratadas.

O tratamento do mosto fermentado em fermentador Chemap, utilizou o fluxograma 4, seguido do fluxograma 8 para semi-purificação com dissolução do precipitado final para bio-ensaio e/ou armazenamento em geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

A obtenção de volumes maiores de mosto possibilitou o emprego do atomizador de partículas "spray dryer" da "Niro atomizer", fluxograma 7. A forma obtida de produto final é a mais conveniente para emprego como inseticida em pó, face a suas características. Foi ensaiado contra moscas de C. chloropyga, comprovando-se sua toxicidade (4.4.3.1) De 30 l de mosto foram obtidas 370g de pó ou seja 12,3 g/l.

Quadro 4.5

Experimento	Volume inicial ml	Volume final ml	Massa final g/l	Fluxograma
XXVIII	1000	100		4-8
XXVIII	1000		2,11	5
XXIX	1000		3,35	5
XXIX	1000		3,78	5
XXX	1000	185		4-8
XXXI	10000		12,3	7
XXXII	10000		15,0	7
XXXII	10000		15,0	7

4.3. Caracterização química qualitativa

Apresentam-se a seguir os resultados obtidos através do espectrógrafo de massa Varian, do Instituto de Química, realizadas leituras entre 1-200, 201-450 e 451-750 para as amostras liofilizadas, pelos experimentos XVII a XIX que se apresentam nos Anexos III a V.

Observa-se pela análise dos produtos liofilizados resultantes dos experimentos XVIII (Bt B) e XIX (Bt P) que são similares entre si e diferem do produto do experimento XVII (Bt A), como que para comprovar que Bt B e Bt P pertencem ao mesmo sorotipo 1 enquanto que o Bt A pertence ao sorotipo 4.

Não houve possibilidade de determinar o peso molecular das exotoxinas produzidas por liofilização. Esta operação deveria ser realizada após a purificação para evitar que outros compostos interferissem na leitura, acarretando valor irreal para o peso molecular. Problemas operacionais impediram a continuidade desses experimentos que serão concluídos em etapas posteriores de estudo.

FILE : 04603E
 TITLE: M 3
 MASS RANGE : 1-200, 201-450, 451-750
 INTEG. TIME: 4, 8, 12
 SECONDS PER SCAN : 10
 THRESHOLD: 1
 MAX. RUN TIME: 10
 INST. RANGE SETTING: H

TEMP. AMOSTRA: 210C

M 3

SPEC. #	32						
0	.00	.26	.24	.09	.00	.00	.00
7	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
14	.00	.00	.00	.12	.75	.29	.00
21	.00	.00	.00	.00	.00	.26	5.05
28	42.83	19.21	63.46	5.03	11.69	2.75	15.99
35	.24	.92	.00	.14	1.19	1.39	10.18
42	12.45	73.82	100.00	100.00	10.91	13.55	5.93
49	.41	.29	.14	.26	.75	2.71	12.33
56	12.08	24.49	14.82	3.71	35.38	9.98	.73
63	.34	1.05	.41	.41	1.53	3.68	10.23
70	36.31	7.17	15.45	14.52	20.63	9.59	1.83
77	.63	.51	.95	1.44	2.95	4.61	4.10
84	6.39	5.47	26.10	4.66	1.39	1.29	1.12
91	4.54	1.56	1.00	2.63	2.53	2.95	3.29
98	3.49	3.10	2.17	1.24	1.36	2.29	.78
105	.95	.63	2.22	3.51	1.83	2.14	1.68
112	1.66	1.78	1.80	1.02	.68	.39	.26
119	.48	2.58	1.07	2.66	1.58	.97	1.24
126	1.24	.80	1.31	.70	.51	.39	.34
133	.63	.31	1.19	1.70	1.26	.85	.90
140	.87	.36	.56	.43	.21	.24	.24
147	.39	.36	1.22	.83	.78	.58	.92
154	4.81	.83	.65	.48	.19	.17	.21
161	.19	.21	.51	.58	.41	.56	.63
168	.53	.31	.56	.29	.19	.29	.12
175	.12	.17	.19	.19	.17	.29	.17
182	.17	.17	.19	.14	.14	.07	.04
189	.04	.04	.07	.04	.07	.24	.07
196	.04	.07	.04	.00	.00	.04	.03
203	.04	.07	.04	.03	.02	.04	.02
210	.04	.04	.02	.02	.00	.00	.00
217	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
224	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
231	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
238	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
245	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
252	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
259	.00	.02	.00	.02	.00	.00	.00
266	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
273	.00	.00	.00	.00	.00	.07	.00
280	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
287	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
294	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
301	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
308	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
315	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
322	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
329	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
336	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
343	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
350	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
357	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
364	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
371	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
378	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
385	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
392	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
399	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
406	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
413	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
420	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
427	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
434	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00

ANEXO III - Leituras obtidas para a Amostra liofilizada de Bt A.

FILE: 04604E
 TITLE: N 3
 MASS RANGE: 11-200, 201-450, 451-750
 INTEG. TIME: 4, 8, 12
 SECONDS PER SCAN: 10
 THRESHOLD: 1
 MAX. RUN TIME: 10
 INST. RANGE SETTING: H

TEMP. AMOSTRA: 210C

N 3

SPEC. #

36

0	.00	1.14	1.14	.48	.00	.00	.00
7	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
14	.00	.17	.24	1.00	7.17	.36	.00
21	.00	.00	.00	.00	.00	.34	6.22
28	44.51	19.87	34.70	10.81	8.74	2.17	6.83
35	.34	.51	.00	.19	3.63	3.22	24.98
42	39.68	100.00	100.00	100.00	7.35	23.17	16.23
49	1.14	.35	.36	1.02	2.07	16.19	12.23
56	14.43	21.80	34.76	16.87	100.00	20.00	2.29
63	.31	1.26	.83	1.22	4.12	5.93	10.62
70	20.97	11.94	5.86	15.94	8.64	2.33	.48
77	.80	1.26	2.05	3.68	6.61	5.59	4.39
84	9.40	6.32	4.66	7.64	2.46	3.39	.90
91	4.34	1.83	2.53	8.66	6.76	4.61	5.54
98	5.03	5.00	1.75	.92	.95	2.90	2.22
105	1.68	1.26	3.54	3.63	4.98	4.05	3.66
112	2.58	2.58	1.88	1.05	.53	.75	.65
119	1.05	2.41	3.00	10.06	4.15	3.76	3.44
126	1.24	1.24	1.85	.75	.51	.56	.53
133	1.00	.97	4.61	10.03	3.80	1.92	2.02
140	1.24	.83	.36	.58	.34	.56	.61
147	1.19	.87	1.85	1.85	4.07	1.85	1.48
154	8.08	1.51	1.00	.68	.36	.61	1.51
161	.85	.65	1.75	1.68	1.24	1.14	1.36
168	1.05	.68	.70	.73	.58	.87	.46
175	.56	.63	.68	.65	.51	.43	.48
182	.39	.26	.36	.51	.36	.36	.31
189	.34	.31	.24	.19	.21	.56	.26
196	.14	.14	.12	.14	.12	.17	.14
203	.14	.15	.13	.09	.09	.10	.06
210	.09	.08	.07	.06	.06	.06	.06
217	.04	.03	.03	.03	.03	.02	.02
224	.00	.02	.02	.03	.04	.03	.06
231	.06	.03	.02	.03	.04	.04	.04
238	.03	.02	.02	.03	.03	.02	.06
245	.02	.04	.04	.02	.02	.02	.03
252	.02	.02	.00	.02	.00	.03	.02
259	.03	.09	.03	.18	.08	.06	.02
266	.02	.02	.02	.00	.00	.00	.00
273	.00	.00	.00	.00	.00	.06	.02

441	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
448	.00	.00	.00	.01	.01	.00	.00
455	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
462	.00	.00	.01	.01	.01	.00	.00
469	.00	.00	.00	.00	.00	.01	.00
476	.00	.00	.02	.00	.01	.00	.00
483	.00	.00	.00	.00	.00	.01	.01
490	.01	.00	.02	.00	.00	.00	.00
497	.00	.00	.00	.00	.01	.02	.00
504	.02	.01	.03	.02	.00	.00	.00
511	.00	.00	.00	.01	.00	.01	.00
518	.00	.01	.02	.00	.00	.00	.00
525	.01	.01	.00	.03	.01	.02	.03
532	.03	.01	.02	.00	.00	.00	.00
539	.00	.00	.00	.01	.01	.01	.00
546	.02	.00	.01	.00	.00	.00	.07
553	.02	.00	.00	.00	.00	.00	.00
560	.02	.00	.01	.00	.00	.00	.00
567	.00	.00	.00	.01	.00	.02	.02
574	.05	.20	.30	.18	.47	.17	.09
581	.03	.00	.00	.01	.00	.02	.00
588	.03	.02	.03	.01	.02	.00	.00
595	.00	.02	.04	.11	.25	.31	.47
602	.54	.39	.66	.30	.24	.08	.03

ANEXO IV - Leituras obtidas para a Amostra liofilizada de Bt B.

INTEG. TIME: 4.8.12
 SECONDS PER SCAN: 10
 THRESHOLD: 1
 MAY. RUN TIME: 10
 INST. RANGE SETTING: H

TEMP. AMOSTRA: 210C

0 3

SPEC. 23

0	.00	.73	.78	.43	.00	.00	.00
7	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
14	.00	.07	.09	.41	1.97	.24	.00
21	.00	.00	.00	.00	.00	.14	3.07
28	47.39	23.12	54.87	9.20	10.81	4.37	18.73
35	.39	.78	.00	.12	1.29	1.85	15.57
42	21.46	100.00	100.00	100.00	17.55	33.52	12.47
49	.92	.56	.17	.43	.92	4.17	15.01
56	13.79	39.43	36.11	6.66	71.77	15.79	.97
63	.17	1.36	.39	.43	2.41	4.32	7.05
70	20.04	8.84	8.62	13.35	14.04	10.28	1.53
77	.73	.68	1.17	1.73	5.29	4.51	4.24
84	9.64	7.30	11.69	5.73	1.85	1.39	1.31
91	4.83	1.17	1.22	4.51	3.68	3.27	3.63
98	4.66	3.58	2.24	1.17	.92	2.44	.83
105	.78	.68	2.56	3.61	2.17	2.41	2.36
112	1.44	1.73	1.88	.75	.41	.36	.29
119	.46	1.41	1.41	2.56	1.34	1.80	1.31
126	.70	.61	1.12	.51	.29	.31	.24
133	.51	.51	1.70	1.41	1.51	1.26	.75
140	.83	.41	.41	.26	.21	.26	.24
147	.51	.48	.95	1.00	1.39	.78	.75
154	6.15	.80	.51	.36	.19	.19	.17
161	.36	.31	.56	1.34	.61	.51	.65
168	.51	.29	.39	.31	.24	.34	.19
175	.24	.21	.29	.41	.21	.26	.26
182	.19	.17	.21	.24	.12	.14	.09
189	.09	.07	.12	.04	.04	.34	.09
196	.00	.04	.00	.00	.00	.03	.00
203	.02	.02	.00	.00	.00	.00	.00
210	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
217	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
224	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
231	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
238	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
245	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
252	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
259	.00	.00	.00	.02	.00	.00	.00
420	.00	.00	.00	.00	.02	.00	.00
427	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
434	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
441	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
448	.03	.00	.03	.01	.01	.00	.00
455	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
462	.00	.00	.02	.00	.00	.00	.00
469	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
476	.01	.01	.03	.01	.01	.00	.00
483	.00	.00	.00	.01	.00	.02	.00
490	.02	.00	.03	.00	.00	.00	.00
497	.00	.00	.00	.01	.01	.02	.00
504	.03	.02	.03	.01	.00	.00	.00
511	.00	.00	.00	.01	.00	.00	.00
518	.01	.01	.01	.00	.00	.00	.00
525	.00	.00	.00	.03	.01	.01	.00
532	.06	.03	.02	.00	.00	.00	.00
539	.00	.00	.00	.01	.00	.00	.00
546	.02	.00	.00	.00	.02	.00	.08
553	.02	.00	.00	.00	.00	.00	.00
560	.01	.00	.00	.00	.00	.00	.00
567	.00	.00	.00	.00	.00	.01	.03
574	.04	.15	.22	.14	.39	.15	.05
581	.00	.00	.00	.00	.00	.01	.01
588	.02	.00	.03	.01	.01	.00	.00
595	.00	.01	.03	.06	.15	.21	.27
602	.31	.20	.37	.15	.12	.03	.01

ANEXO V - Leituras obtidas para a Amostra liofilizadas de Bt P.

4.4. Bioensaios

4.4.1. Para Drosophila melanogaster

Os produtos obtidos nos experimentos XXIII a XXVII após purificação conforme metodologia 3.11 forneceram diversas frações de 200 ml. Levadas ao espectrofotômetro da Perkin Elmer foram verificados máximo e mínimo de absorção ao ultra violeta.

O inseto-teste Drosophila melanogaster foi criado no laboratório e seus ovos foram colocados sobre fubá gelatinizado contendo a fração teste, em copos recobertos com filme de polietileno perfurado, levados a incubador a 25°C e 80% de UR. A verificação de não-emergência de moscas nos lotes tratados com algumas das frações teste e a emergência em lotes testemunha, caracterizou a atividade da exotoxina termo-estável de Bacillus thuringiensis. As frações que não apresentaram máximo e mínimo de absorção ao UV coincidiram com as frações não tóxicas.

À dieta do inseto não se acrescentou extrato de levedura, devido ao efeito inibidor que ele acarreta mascarando assim a atividade tóxica, conforme relatado por Perron e Benz (86) e Benz e Perron (9) com Drosophila sp e por Zemp (102) com Musca sp.

4.4.2. Para Musca domestica, Chrysomya chloropyga e Chrysomya megacephala

Foi empregada a metodologia apresentada em 3.13.3 com os seguintes resultados:

4.4.2.1. Para Chrysomya chloropyga foram utilizadas alíquotas de 0,01; 0,02; 0,05; 0,25 e 1,0 ml de produto concentrado pelo fluxograma 4 (item 3.9.1) obtido de fermentação do experimento XV com Bt B.

O produto concentrado obtido no experimento XVI com Bt P, foi semi purificado pelo fluxograma 8 e ensaiado

em alíquotas de 0,01; 0,02; 0,05; 0,25 e 1,0 ml.

O produto concentrado obtido de Bt A no experimento XIV foi utilizado em alíquotas de 1 e 1,5 ml. Cada alíquota < 0,5 ml foi adicionada a meio de cultura 2 estéril, completando 1,0 ml após o que foi-lhe adicionado 4 ml de leite. Cada copo do experimento recebeu 5 ml de solução exotoxina + meio + leite. As alíquotas > 0,5 ml foram completadas a 5,0 ml com leite.

Todas as dietas da literatura utilizam extrato de levedura para alimentação de insetos nas diferentes fases do crescimento. A maioria dos pesquisadores que se utilizaram de dietas padrão para insetos constataram o efeito inibitório à atuação da exotoxina pelo extrato de levedura (9, 86, 102). Assim sendo em nossas dietas para teste do produto não utilizamos extrato de levedura, nem para o lote testemunha que continha 1 ml de meio de cultura 2 estéril e 4 ml de leite.

Os quadros 4.6 a 4.8 apresentam os percentuais de mortalidade de Chrysomya chloropyga tendo-se empregado dez larvas neonatas em cada lote com cinco repetições. As larvas foram mantidas nos copos, em incubador a 30°C por 15 dias. As moscas emergentes vivas ou mortas, perfeitas ou defeituosas foram contadas, bem como as que permaneceram na fase de pupa. O percentual de mortalidade na fase larval foi obtido por diferença.

Nestes bioensaios pode-se notar além da mortalidade acarretada ao inseto nas diferentes fases do crescimento, o aparecimento do adulto deformado especialmente pela ausência de asas, efeito teratológico relatado por diversos autores (2, 3, 5, 12).

O produto obtido em Fermentador Chemap e atomizado foi testado contra C. chloropyga obtendo-se taxas de mortalidade larval de 62 a 66% para fração equivalente a 1 ml de mosto integral.

Quadro 4.6. Mortalidade de C. chloropyga com Bt B

Fase	mortalidade %				
	0,01	0,02	0,05	0,25	1,0
Pupa	56	54	02	0	6
Mosca morta	0	0	34	20	0
Mosca defeituosa	0	0	8	0	0
Mosca viva	0	0	4	4	2
Larva	44	46	56	76	92

Quadro 4.7. Mortalidade de C. chloropyga com Bt A

Fase	mortalidade %		
	0,5	1,0	1,5
Pupa	18	14	0
Mosca morta	0	22	16
Mosca defeituosa	0	2	0
Mosca viva	0	4	0
Larva	82	58	84

Quadro 4.8. Mortalidade de C. chloropyga com Bt P

Fase	Mortalidade %				
	0,01	0,02	0,05	0,25	1,0
Pupa	42	10	6	8	08
Mosca morta	0	4	10	8	6
Mosca defeituosa	0	4	0	0	0
Mosca viva	0	4	2	0	2
Larva	58	78	82	84	84

4.4.2.2. Para Chrysomya megacephala

Foram empregadas apenas concentrações de 1 ml de exotoxina em 4 ml de leite, para os três microrganismos em estudo.

Foram encontrados os seguintes resultados:

Quadro 4.9. Mortalidade de C. megacephala com Bt A, Bt B, Bt P.

Fase	Mortalidade		
	Bt A	Bt B	Bt C
Pupa	2%	0 %	3%
Larva	98%	100%	97%

4.4.2.3. Para Musca domestica

Foram testadas alíquotas de 0,1; 0,5 e 1,5 ml de exotoxina (concentrada pelo fluxograma 4) de Bt A; 0,01; 0,02 e 0,05 ml de exotoxina (concentrada pelo fluxograma 4) de Bt B e 0,01; 0,02 e 0,05 ml de exotoxina (concentrada e semi purificada pelo fluxograma 8) de Bt P.

Obtiveram-se os resultados que se apresentam nos quadros 4.10 a 4.12:

Quadro 4.10. Mortalidade de M. domestica com Bt A

Fase	Mortalidade %		
	0,1	0,5	1,5
Pupa	20	10	35
Mosca morta	0	25	20
Mosca defeituosa	0	0	0
Mosca viva	0	0	0
Larva	80	65	45

Quadro 4.11. Mortalidade de M. domestica com Bt B

Fase	Mortalidade %		
	0,01	0,02	0,05
Pupa	25	20	20
Mosca morta	15	10	15
Mosca defeituosa	0	0	0
Mosca viva	0	0	0
Larva	60	70	65

Quadro 4.12. Mortalidade de M. domestica com Bt P

Fase	Mortalidade %		
	0,01	0,02	0,05
Pupa	0	10	30
Mosca morta	60	0	15
Mosca defeituosa	0	10	0
Mosca viva	0	0	15
Larva	40	80	40

4.4.3. Para Ceratitis capitata

4.4.3.1. Ovos

O bioensaio realizado com aplicação de 1 ml de mosto concentrado sobre os 100 ovos de C. capitata resultou em setenta a noventa por cento de eclosão, dando nascimento a larvas cujo desenvolvimento foi muito lento tendo a carretado mortalidade total durante o estágio de desenvolvimento larval. Foram usados os mostos concentrados, produtos dos experimentos I e II.

4.4.3.2. Pupas

Foi realizado o bioensaio conforme a metodologia apresentada em 3.13.2. Um mililitro de mosto concentrado foi aspergido sobre as cem pupas. Foi utilizado o produto obtido através dos experimentos II e III. Os resultados foram os seguintes:

Quadro 4.13. Mortalidade na fase de pupa

Produto	Adultos vivos	Adultos mortos	Pupas mortas
Experimento II	77	-	23
Experimento III	72	1	27
Controle	82	-	18

Não houve observação posterior para verificar se os adultos assim obtidos eram plenamente sadios ou se teria acontecido possível efeito teratológico causado pelo emprego da exotoxina.

4.4.3.3. Insetos-Adultos

Os produtos obtidos nos experimentos I e V foram ensaiados com o inseto adulto. Um mililitro da solução teste foi oferecida aos insetos que ingeriram desse líquido no transcorrer de suas vidas. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro 4.14 e nas figuras 4.4 e 4.5.

Observa-se que a mortalidade cumulativa atingiu seu máximo valor no entorno de 22 dias. Foram corrigidos os valores obtidos, com relação à mortalidade natural ocorrida no controle.

A mortalidade cumulativa para cada ensaio, deduzida da mortalidade natural no controle (por sexo), resultou em curva de distribuição normal. Para o ensaio do expe

Dias	Exp. I		Exp. V		Controle	
	M	F	M	F	M	F
1	1	2	-	2	1	2
2	-	2	4	2	-	-
3	1	2	2	-	-	-
6	3	5	4	5	1	2
7	3	3	1	3	-	-
8	-	3	3	2	1	3
9	2	1	2	2	1	-
10	4	1	3	2	1	1
13	4	5	5	6	3	2
14	3	2	-	-	1	4
15	-	2	3	4	-	-
16	2	3	2	3	-	2
17	2	-	4	4	-	1
20	5	4	6	4	2	3
21	3	4	2	3	1	2
22	-	3	-	-	3	-
23	3	1	-	1	3	1
24	1	2	-	-	4	1
27	2	3	3	1	7	3
28	3	-	-	-	1	3
29	2	2	1	-	2	1
30	-	-	-	-	1	2
31	-	-	-	-	4	1
34	6	-	2	6	6	8
35	-	-	2	-	2	3
36	-	-	1	-	-	1
42	-	-	-	-	5	4

Quadro 4.14 Mortalidade diária de insetos adultos de Ceratitis capitata

rimento I a mortalidade total dos machos foi atingida aos 34 dias e das fêmeas aos 29 dias, enquanto que para o produto do experimento V foi aos 36 dias para os machos e 34 dias para as fêmeas. O controle apresentou mortalidade total aos 42 dias. A literatura apresenta 33 dias como tempo de vida média de C. capitata. A dieta oferecida aos insetos não continha extrato de levedura, afim de que os resultados não fossem mascarados pelo efeito inibidor da levedura sobre a exotoxina do Bacillus thuringiensis, fato comprovado na literatura em dietas especialmente usadas para Drosophila melanogaster e Musca domestica-

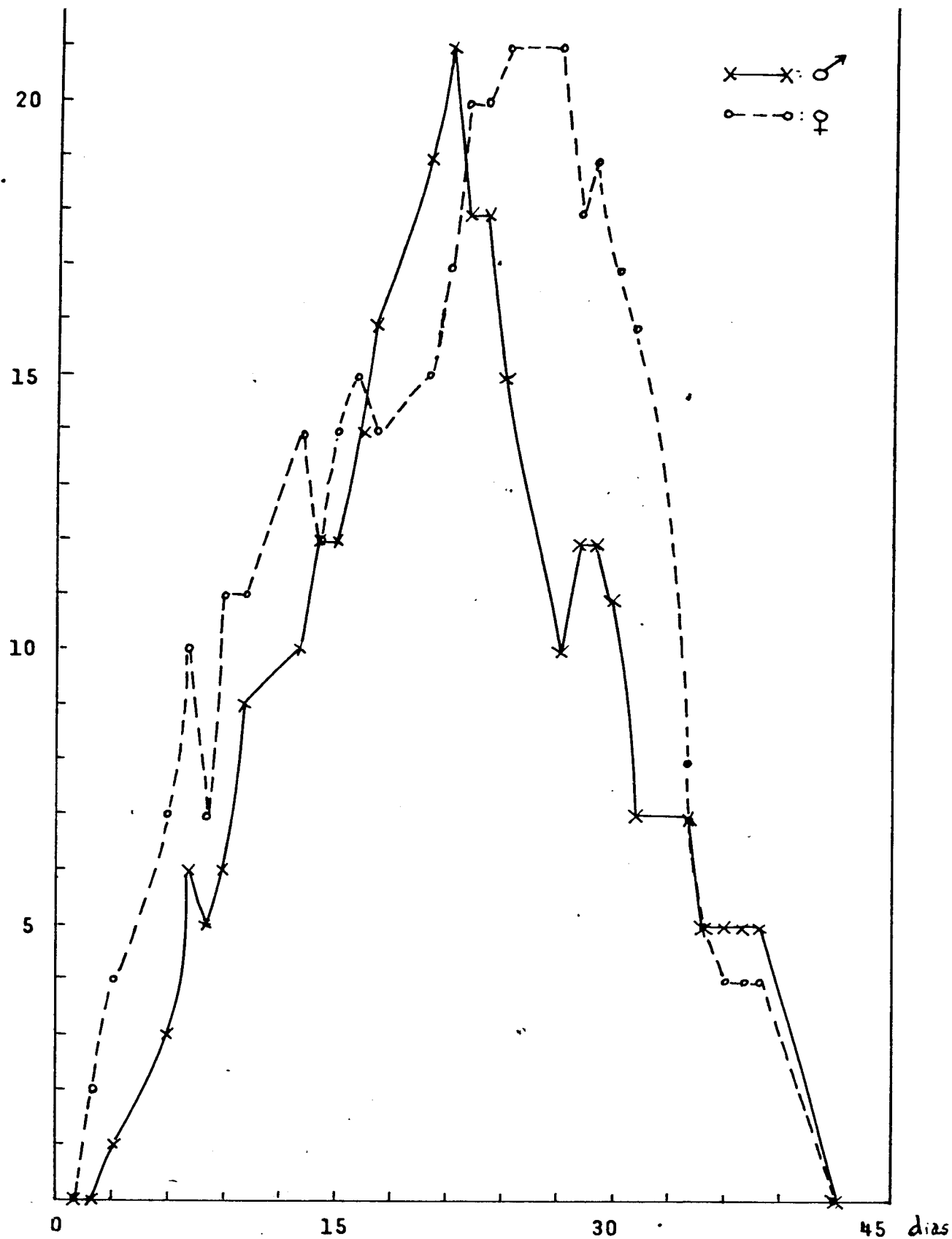


Figura 4.4 - Distribuição da mortalidade cumulativa de insetos adultos de C. capitata com o produto do experimento I.

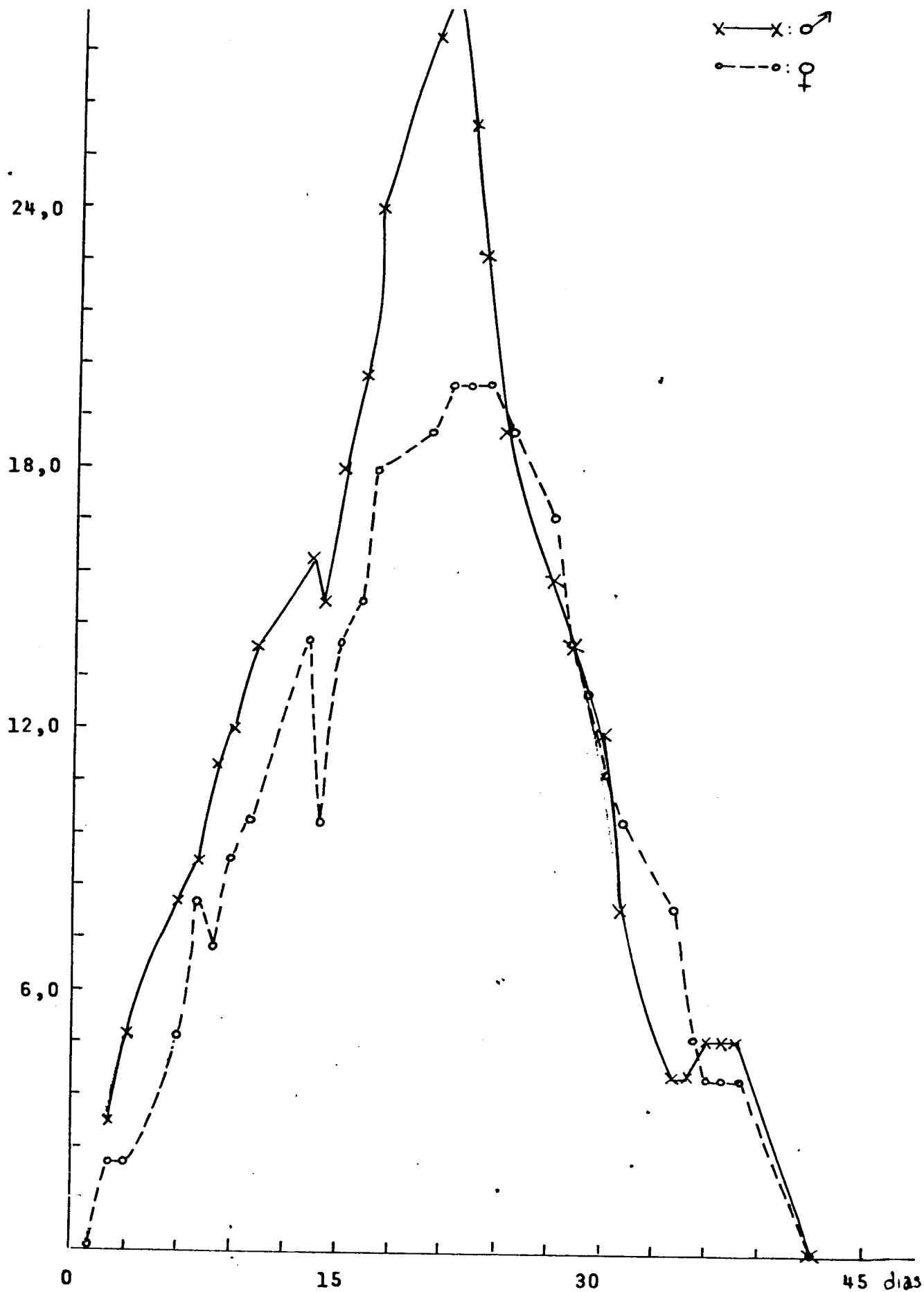


Figura 4.5 - Distribuição da mortalidade cumulativa de insetos adultos de C. capitata com o produto do experimento V.

5. CONCLUSÕES

- 5.1. O meio de cultura composto de melaço e água de maceração de milho, dentro das condições estudadas permitiu reduzir o período de fermentação de Bacillus thuringiensis tanto em escala de mini-fermentador, como em escala piloto a valores menores que a metade dos reportados na literatura, com rendimentos superiores.
- 5.2. A concentração de Oxigênio Dissolvido afetou a taxa de respiração e consequentemente a velocidade específica de crescimento do Bacillus thuringiensis. O melhor valor foi atingido no entorno de 10% do valor de saturação. Concentrações superiores ou inferiores a esse valor acarretaram queda de produtividade do inseticida.
- 5.3. A concentração de ácido dipicolínico foi máxima após concluída a fase exponencial de crescimento do microrganismo, quando o teor de endotoxinas é máximo.
- 5.4. Os processos de separação utilizados permitiram obter exotoxinas termo-estáveis não purificadas, com razoável conteúdo tóxico, comprovado pelos bioensaios.
- 5.5. A caracterização química da exotoxina através do espectrógrafo de massa não ofereceu resultados conclusivos, devido ao emprego de amostras liofilizadas, não purificadas previamente. Não obstante comprovou a similaridade entre Bt B e Bt P, que pertencem ao mesmo sorotipo.
- 5.6. Mais importante que a caracterização química do produto tóxico é a aplicação do bioensaio, para constatação da toxicidade efetiva.
- 5.7. Comprovou-se o efeito das exotoxinas termo-estáveis de Bacillus thuringiensis obtidas por fermentação, em bioensaios

realizados com Dípteros: Drosophila melanogaster, Chrysomya chloropyga, Chrysomya megacephala, Musca domestica e Ceratitis capitata.

5.8. As dosagens utilizadas variaram entre 0,01 a 1,0 ml de mosto concentrado (= 4 vezes) para Chrysomya sp e de 0,01 a 1,5 ml para Musca sp. Com Ceratitis foi empregado 1 ml de mosto concentrado.

5.9. Foi constatado que além da mortalidade acarretada nas diferentes fases de desenvolvimento do inseto, também ocorreu efeito teratológico, com insetos cujo defeito principal foi a ausência ou atrofia das asas.

6. RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

6.1. Deverá ser realizada purificação completa da exotoxina termo-estável para posterior caracterização química.

6.2. Estudos de padronização da exotoxina deverão ser realizados comparando frações purificadas em suas diferentes etapas, com resultados de bioensaios afim de determinar a Unidade de Toxicidade.

6.3. É interessante a adoção de um inseto (Díptero) para atuar como padrão, nas dosagens com as exotoxinas termo-estáveis afim de melhor acompanhar a produção durante a fermentação. Os muscideos apresentam um comportamento que facilita esse estudo.

6.4. Há necessidade de aplicação da toxina termo-estável em testes de campo, visando determinar a suscetibilidade dos Dípteros sob as condições de temperatura, insolação, pluviosidade, orvalho, etc.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, R.F. & Ignoffo, C.M. "Microbial Insecticides. In Microbial Technology". (H.P. Peppler Ed.) N. York Reinhold Publ. Corp. 172-181, 1967.
2. Angus, T.A. "Symposium on microbial insecticides. I. Bacterial Pathogens of insects as microbial insecticides". Bact. Review 29 (3) : 364-371, 1965.
3. Angus, T.A. "The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide". World Review of Pest Control 7 (1): 10-26, 1968.
4. Angus, T.A. "Implications of some recent studies of Bacillus thuringiensis - A personal purview". Proceedings, IVth International Colloquium on Insect Pathology, College Park Md USA 183-189, 1970.
5. Bachi, P.T.; Motta, I.; de Barjac, H. & Laurent, P. "Mise en evidence d'un pouvoir mitogène chez l'exotoxine thermostable de Bacillus thuringiensis". C.R. Acad. Sc. Paris 285 : 455-457, 1977.
6. Bassand, D. & Carpy, S. "Absence of β exotoxin in thuricide preparations". Experientia 33 : 1545- , 1977.
7. Benz, G. "On the chemical nature of the heat-stable exotoxin of Bacillus thuringiensis". Experientia 22 : 81-83, 1966.
8. Benz, G. "Action of Bacillus thuringiensis preparation against larch bud moth Zeiraphera diniana (Gn), enhanced by β exotoxin and DDT. Experientia 31(11) : 1288-1290, 1975.

9. Benz, G. & Perron, J.M. "The toxic action of Bacillus thuringiensis "exotoxin" on Drosophila reared in yeast containing and yeast free media". Experientia 23 : 871-874, 1967.
10. Bond, R.P.M.; Boyce, C.B.C & French, S.J. "A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from Bacillus thuringiensis Berliner". Biochem J. 114 : 477-488, 1969.
11. Bond, R.P.; Boyce, C.B.; Rogoff, M.H. & Shieh, F.R. "The thermostable exotoxin of Bacillus thuringiensis In Microbial Control of Insects and Mites". (H.D. Burges and N.W. Hussey, eds), pp. 275-304 Academic Press, London, 1971.
12. Briggs, J.D. "Reduction of adult house-fly emergence by the effects of Bacillus spp on the development of immature forms". Journal of Insect Path 2 (4) : 418-432, 1960.
13. Briggs, J.D. "Commercial Production of Insect Pathogens In Insect Pathology an advanced treatise". Academic Press, Inc. New York 2 : 519-548, 1963.
14. Burgerjon, A. "Principes thermostables dans les preparations industrielles a base de Bacillus thuringiensis Berliner". Coll. Int. Pathol. Insects, Paris, 1962 227-237, 1962.
15. Burgerjon, A. "Au sujet de la caractèrization des produits a base de Bacillus thuringiensis Berliner par rapport au titrage biologique de la toxine soluble thermostable". Entomophaga 10 (1) : 55-65, 1965.

16. Burgerjon, A. "Quelques effects physiologiques de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis sur le Doryphore Leptinotarsa Decemlineata". Ent. exp. & appl. 15 : 112-127, 1972.
17. Burgerjon, A. & de Barjac, H. "Nouvelles donnees sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par Bacillus thuringiensis Berliner". Comptes rendues des séances de l'Academie des Sciences 251 : 911-912, 1960.
18. Burgerjon, A. et de Barjac, H. "Essais preliminaires sur le rôle insecticide de la toxine thermostable produite par Bacillus thuringiensis Berliner". XI Internationaler Kongress Für Entomologie, Wien 835-839, 1960.
19. Burgerjon, A. & de Barjac, H. "E'tude de la toxine soluble thermostable chez differentes souches de Bacillus thuringiensis Berliner". Coll. Int. Pathol. Insectes, Paris 221-226, 1962.
20. Burgerjon, A. & de Barjac, H. "Another serotype (4:4a, 4c) of Bacillus thuringiensis which produces thermostable toxin". J. Inv. Path. 9 (4) : 574-577, 1967.
21. Burgerjon, A. et de Barjac, H. "Studies on the presence of the thermostable toxin in serotypes 10, 11, 12 of Bacillus thuringiensis". J. Invert. Path. 21 (3) : 325-327, 1973.
22. Burgerjon, A. & Biache, G. "The activity of the heat-stable toxin of Bacillus thuringiensis Berliner used in nature against the larvae of Diprion pini (Linnaeus) Journal of Insect Pathology 6 (4) : 538-541, 1964.

23. Burgerjon, A. & Biache, G. "Alimentation au laboratoire de Perillus bioculatus Fabr. Avec des Leptinotarsa decemlineata Say intoxiqués par la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis Berliner". Entomophaga II (3) : 279-284, 1966.
24. Burgerjon, A. & Galichet, P.F. "The effectiveness of the heat-stable toxin of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner on larvae of Musca domestica (Linnaeus)". J. Inv. Path. : 7 (2) : 263-264, 1965.
25. Burgerjon, A.; Grison, P. & Kachkauli, A. "Activity of the heat-stable toxin of Bacillus thuringiensis Berliner in locusta migratoria (Linnaeus) (Locustidae, orthoptera)". J. Inv. Path. 6 (3) 381-383, 1964.
26. Burgerjon, A. & Grison, P. "Effects de Bacillus thuringiensis Berliner (cristaux-spores et toxine thermostable) sur le potentiel biologique de Zeiraphera diniana Gn. Annales des Sciences forestières, 28 (4) : 391-401, 1971.
27. Burges, H.D. "Control of insects by Bacillus thuringiensis". Proceed 5th Br. Insect. Fungic. Conf. 405-411, 1969.
28. Cantwell, G.E.; Heimpel, A.M. & Thompson, M.J. "The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner". J. of Insect Path 6 (4): 466-480, 1964.

29. Cantwell, G.E.; Knox, D.A. & Michael, A.S. "Mortality of honey bees, Apis mellifera Linnaeus fed exotoxin of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner". J. Insect Pathol. 6 (4) 532-536, 1964.
30. Carson, R. "Silent Spring (1962)". Trad. Ed. Melhoramentos Primavera Silenciosa, 1964.
31. Charmoille, L.; Vincent, B.; d'Oultremont, Ph.; Debacq; J.J. & Prunet, P. "Titration biologique des préparations industrielles à base de Bacillus thuringiensis Berliner à l'aide d'Anagasta kuhniella Z. et de Musca domestica L.". Phytia-trie-Phytopharmacie, 23 : 223-234, 1974.
32. Conner, R.M. & Hansen, P.A. "Effects of valine, leucine, and isoleucine on the growth of Bacillus thuringiensis and related bacteria". J. of Invert. Path. 9 : 12-18, 1967.
33. Conner, R.M. & Hansen, P.A. "Toxigenicity of Bacillus thuringiensis". J. Invert. Path 9 : 114-125, 1967.
34. De Barjac, H. et Bonnefoi, A. "Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type Bacillus thuringiensis". Entomophaga 7 (1) : 5-31, 1962.

35. De Barjac, H. et Bonnefoi, A. "Classification des souches de Bacillus thuringiensis. C.R. Acad. Sc. Paris, 264 : 1811-1813, 1967.
36. De Barjac, H. et Burgerjon, A. "Studies on the presence of the thermostable toxin in serotypes 10, 11 and 12 of Bacillus thuringiensis". J. Invert. Path. 21 (3) : 325-327, 1973.
37. De Barjac, H. et Dedonder, R. "Purification de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis var. thuringiensis et analyses complementaires". Bull. de la Soc. de Chimie. Biol. 50 (4) : 941-944, 1968.
38. De Barjac, H. et Lecadet, M.M. "Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de Bacillus thuringiensis d'après l'inhibition d'ARN-polymérases bactériennes ". C.R. Acad. Sc. Paris, 282, 2119-2122, 1976.
39. De Barjac, H. et Riou, J.Y. "Action de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis var. thuringiensis administrée à des souris". Review de Path. Comparée et de Médecine Expérimentale 6 (6) : 367-374, 1969.
40. Demain, A.L.; Vitali, R.A.; Wilker, B.W. and Rothrock, J.W.; Jacob, T.S. "Extra cellular guanosyne 5'-monophosphate and guanosyne 5'-diphosphate in Bacillus subtilis broths. Biotech. & Bioeng., 6, 361-365, 1964.
41. Dulmage, H.T. "Aspects of the Industrial production of microbial insect control agents". Insect Path and Microbial control North Holland, Amsterdam, 1967.

42. Dunn, P.H. "Control of house flies in bovine feces by a feed additive containing Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner. J. Insect Pathol 2: 13-16, 1960.
43. Farkas, J., Sebesta, K., Horska, K., Dolejs, L. & Sorm, F. "The structure of exotoxin of Bacillus thuringiensis var. Gellechiae Coll Czech. Chem. Commun 34: 1118-1120, 1969.
44. Faust, R.M. "The Bacillus thuringiensis exotoxin : current status". Bulletin of the entomological society of America 19 (3) 153-156, 1973.
45. Fisher, R.R. "Biossay of microbial pesticides In "Analytical Methods for Pesticides". Academic Press, E. Zweig, ed Vol. I : 430-442, 1963.
46. Fisher, R.R. and Briggs, J.D. "Assay of microbial pesticides. In "Developments in Industrial Microbiology". Vol. IV 136, 1963.
47. Fonseca, J.P. & Autuori, M. "Pragas dos citrus". "In" Manual de Citricultura, Vol. 2 : 152-159, 1933.
48. Fonseca, J.P. "Relação das principais pragas observadas nos anos de 1931 a 1933, nas plantas de maior cultivo no Estado de São Paulo". Arq. Inst. Biol. São Paulo 5 : 263-289, 1934.
49. Galo, D. "Manual de entomologia : Pragas das plantas e seu controle". São Paulo Ed. Agronomica Ceres, 1970.
50. Gingrich, R.E. "Bacillus thuringiensis as a feed additive to control dipterous pests of cattle". J. of Econ. Entom. 58 (2) : 363-364, 1965.

51. Guimarães, J.H., Prado, A.P. & Buralli, G.M. "Dispersal and distribution of three newly introduced species of Chrysomya Robineau Desvoidy in Brazil (Diptera calliphoridae)". Rev. Bras. Entom. 23 (4) : 245 - 255, 1980.
52. Habib, M.E.M. & Garcia, M.A. "Suscetibility tests of house fly adults, Musca domestica to Bacillus thuringiensis". Anais da S.E.B., 5 (2) : 194-199, 1976.
53. Hall, J.M. & Arakawa, K.Y. "The susceptibility of the house fly, Musca domestica Linnaeus, to Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner". J. Insect. Pathol. 1 : 351-355, 1959.
54. Hall, I.M., Hunter, D.K. & Arakawa, K.Y. "The effect of the exotoxin fraction of Bacillus thuringiensis on the citraus red mite". J. Invert. Path. 18 (3): 359-362, 1961.
55. Heimpel, A.M. "A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria". Annual Review of Entom. 12 : 287-322, 1967.
56. Heimpel, A.M. & Angus, T.A. "The taxonomy of insect pathogens related to Bacillus cereus Frankland and Frankland". Can J. Microb. 4 : 531-541, 1958.
57. Hempel, A. "Contribuição a Biologia da Ceratitis capitata wied". Bolletim da Agricultura São Paulo 6 (8) : 353-354, 1905.
58. Howard, L.O. "The mediterranean fruit fly. Bulletin n° 640 USDA, 1-43, 1918.
59. Huang, H.T. "Microbial insecticides as fermentation products. In Fermentation Advances". Perlman, Ed. 591-610, 1970.

60. Ignoffo, C.M. "Effects of entomopathogens on vertebrates". Annals of the New York Academy of Sciences 217 : 141-164, 1973.
61. Ignoffo, C.M. "Ignoffo: Vertebrates and Entomopathogens Protocol: Acute toxicity-pathogenicity". Annals of the New York Academy of Sciences 217 : 165-172, 1973.
62. Ignoffo, C.M. & Gard, I. "Use of an Agar Base Diet and House fly larvae to assay exotoxin activity of Bacillus thuringiensis". Journal of Economic Entomology 63 (6):1987-1989, 1970.
63. Ignoffo, C.M. & Gregory, B. "Effects of β exotoxin on larval maturation adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of Lepidoptera". Environmental Entomology 1 (3) : 269-272, 1972.
64. Kim, Y.T. & Huang, H.T. "The β exotoxins of Bacillus thuringiensis. I. Isolation and characterization". J. Invert. Pathology 15, 100-108, 1970.
65. Kim, Y.T., Gregory, B.C. & Ignoffo, C.M. "The β exotoxins of Bacillus thuringiensis. III Effects on in vivo synthesis of macromolecules in an insect system". J. Invert. Path. 20 (1) : 46-50, 1972.
66. Kim, Y.T., Gregory, B.G., Ignoffo, C.M. & Shapiro, M. "The β exotoxin of Bacillus thuringiensis. IV Effects on in vitro synthesis of macromolecules in an insect cell line". J. Inv. Path. 20 (3) : 284-287, 1972.
67. Klier, A.F., Lecadet, M.M. & Dedonder, R. "Sequential modifications of DNA Dependent RNA Polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis". Eur. J. Biochem. 36 : 317-327, 1973.

68. Krieg, A. "Bacillus thuringiensis Berliner. Mitt. Biol. Bunderanstalt Land Forstwirtschaft". Berlin-Dahlem 103 : 3-79, 1961.
69. Krieg, A. "Bioassay and standardization of Bacillus thuringiensis preparations: spore-endotoxin complex". Entomophaga: 10 (1) : 49-54, 1965.
70. Krieg, A. "Transformations in the Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis group. Description of a new subspecies: Bacillus thuringiensis var. toumanoffii J. Invert. Path. 14 : 279-281, 1969.
71. McConnell, E. & Richards, G. "The production by Bacillus thuringiensis Berliner of a heat-stable substance toxic for insects". Can. J. Microb. 5 :161-168, 1959.
72. Mechalias, B.J. & Beyer, O. "Production and assay of extracellular toxins by Bacillus thuringiensis". Devel. Ind. Microbiol. 4 : 142-147, 1963.
73. Megna, J.C. "US patent 3076922-1963. In "Microbial Control of Insects and Mites". Acad. Press, London, 1973.
74. Millar, E.S. "Bacillus thuringiensis in the control of flies breeding in the droppings of caged hens". N.Z. J. Agric. Res. 8 : 721-722, 1965.
75. Moraes, I.O. "Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. FEA/UNICAMP, 60 pp., BRASIL, 1973.
76. Moraes, I.O. "BR Patente PI 7608688 - Processo de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano". BR Patente PI 7608688, 4 pp, 1976.

77. Moraes, I.O. "Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em Mini Fermentador". Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, 76 pp., Brasil, 1976.
78. Moraes, I.O. & Chaib, M.A. "Bioassay for microbial insecticide". Process biochem. 13 (10) : 23-24, 1978.
79. Moraes, I.O., Hokka, C.O. & Nakamura, I.M. "Kinetic studies on growth and sporulation of Bacillus thuringiensis". Fifth Intern. Cong. of Food Science and Technol. - Kyoto, Japão 241, 1978.
- 79a. Moraes, I.O.; Hokka, C.O.; Santana, M.H.A. e Villarinho, A.N. "Mathematical model of growth and sporulation of Bacillus thuringiensis". 27th International Union of Pure and Applied Chemistry, Helsinki, Finlândia : 533, 1979.
80. Norris, J.R. "The classification of Bacillus thuringiensis". J. Appl. Bacteriol. 27 : 439-47 , 1964.
81. Norris, J.R. "Microbial insecticides". Reports on the Progress of Appl Chem. 52 : 478-483, 1967.
82. Norris, J.R. "Sporeformers as insecticides". J. Appl. Bact. 33 : 192-206, 1970.
83. Orlando, A. & Sampaio, A.S. "Moscas de frutas". Notas sobre o reconhecimento e combate. O Biológico 39 : 143-150, 1973,
84. Pais, M. et de Barjac, H. "Identification par des methodes chimiques et spectrales de la toxine thermostable isolée d'un Bacillus thuringiensis du serotype 4a-4c". J. carbohydrates-nucleosides-nucleotides, 1 (3) : 213-223, 1974.
85. Pendleton, I.R. "Insecticides of crystal forming bacteria". Process. Biochem. Dec., 1969.

86. Perron, J.M. & Benz, G. "Effects of yeast and yeast fractions on the action of the so called heat-stable exotoxin of Bacillus thuringiensis in Drosophila melanogaster". J. Invert Path 10 (2) 379-386, 1968.
87. Puzzi, D. & Orlando, A. "Estudos sobre a ecologia das "moscas de frutas" (Trypetidae) no Estado de São Paulo visando o controle racional da praga". Arq. Inst. Biol. 32 (1) : 9-22, 1965.
88. Rasková, H. & Masek, K. "Pharmacology of Bacterial protein toxins In "Microbial Toxins : Bacterial Protein Toxins". (Ajl, S.J., Ciegler, A.; Kadis, S.; Montie, T.C.; Weinbaum, G., ed.) Academic Press , Vol. I : 332, 1970.
89. Rogoff, M.H.; Ignoffo, C.M; Singer, S.; Gard, I.; & Prieto, A.P. "Insecticidal activity of thirty one strains of Bacillus against five insect species". Journal of Invertebrate Pathology 14 122-129, 1969.
90. Rogoff, M.H. & Yousten, A.A. "Bacillus thuringiensis Microbiological considerations". Annual Review of microbiology 23 : 357-386, 1969.
91. Santana, M.H.A. "Estudo de aeração e agitação na fermentação com o Bacillus thuringiensis". Tese de Mestrado - FEA/UNICAMP, 73 pp., 1980.
92. Scherrer, P.; Luthy, P. & Trumpi, P. "Production of endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose concentrations". Appl. Microb. 25 (4): 644-646, 1973.

93. Sebesta, K.; Horska, K. & Vankova, J. "Isolation, purification and toxicity of Bacillus thuringiensis In Insect Pathology and Microbial Control". Colloq. Ins. Path., Wageningen 1966 (P.A. Vander Laan, Ed.). North Holland Publ. Co. 238-242, 1967.
94. Sebesta, K. & Horska, K. "Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of Bacillus thuringiensis var. Gelechia". Biochem. Biophys Acta. 169-281, 1968.
95. Sebesta, K. "Inhibition of RNA Synthesis In Nucleosides as biological probes (R.J. Suhadolnik, ed.) 183-195, 1980.
96. Shieh, T.R.; Anderson, R.F. & Rogoff, M.H. "Regulation of exotoxin production in Bacillus thuringiensis". Bact. Proc. Am. Soc. for Microb. 6, 1968.
97. Souza, H.M.L.; Piedrabuena, A.E. & Pavan, O.H. "Biologia de Ceratitis capitata (Wiedemann) Diptera-Tephritidae). Um novo meio artificial de criação para produção em massa". Papeis avulsos de Zoologia 31 (14) : 213-220, 1978.
98. Tanada, Y. "Microbial pesticides. In Pest Control Biological, physical and selected chemical methods". (Kilgore, Wandell. W., ed). N. York Academic Press. pp. 31-88, 1967.
99. Tremblay, F.L.J.; Huot, L. et Perron, J.M. "Pénétration de l'exotoxine thermostable de Bacillus thuringiensis à travers le chorion d'Acheta domesticus". Entomologia Exp. Appl. 15 (3) : 379-398, 1972.

100. Tremblay, F.L.J., Huot, L. et Perron, J.M. "Effects de l'exotoxine thermostable de Bacillus thuringiensis Berliner sur la consommation d'oxygene par les embryons d'Acheta domesticus (L)". Canadian Journal of Zoology 51 (4) : 433-435, 1973.
101. Yamvrias, C. "Contribution à l'étude du mode d'action de Bacillus thuringiensis Berliner vis à vis de la teigne de la farine Anagasta (Ephestia) kuhniella Zeller". Entomophaga VII (2) : 101-159, 1962.
102. Zemp, H. "Entwicklung und Bewertung eines Biotest verfahrens mit Larven von Musca domestica L. zur Prüfung von Handelspräparaten auf der Basis von Bacillus thuringiensis Berliners Doktor der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zurich, 1969, 50 pp.

8. AGRADECIMENTOS

À Direção da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - UNICAMP;

Aos Professores Dra. Hebe M.L. de Souza e Dr. Angelo Pires do Prado, do Instituto de Biologia da Unicamp, pela criação de Insetos-teste ou condução de bioensaios com o nosso produto;

Aos funcionários e aos colegas, especialmente aqueles do Departamento de Engenharia de Alimentos que direta ou indiretamente nos auxiliaram;

Nossa gratidão