

ANDRÉ LUIZ DE ALMEIDA MELO

**ELABORAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE BIOPROCESSOS
PARA A PRODUÇÃO DE *Bacillus sphaericus* MEYER E
NEIDE (1904) VISANDO O CONTROLE BIOLÓGICO DE
Culex quinquefasciatus SAY (1823)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração Parasitologia, do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.
Co-orientadora: profa Dra. Vanete Thomaz Soccol

Curitiba
2006

AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Carlos Ricardo Soccol, cuja orientação possibilitou contatos, subsídios e infra-estrutura para que o trabalho crescesse e atingisse um resultado acima do esperado.

À professora Doutora Vanete Thomaz Soccol, que me abriu as portas na pesquisa científica e muito tem contribuído à minha formação nestes 5 anos de convivência no Laboratório de Parasitologia Molecular.

A Leim Kou de Almeida Melo, maior incentivadora, conselheira, financiadora, amiga e mãe.

Ao engenheiro químico Radjiskumar Mohan, por me ensinar os primeiros passos no mundo das fermentações e sempre socorrer quando solicitado.

A bióloga Magda Clara V. Costa, a única pessoa que seria capaz de perder um avião por causa de uma garrafinha com larvas de mosquito para um amigo.

A bióloga Samira Chahad Ehlers, que contribuiu nas diversas conversas científicas que sempre ajudam e mesmo aquelas nada científicas de utilidade duvidosa.

A empresa IMCOPA (Araucária - PR), por ceder os produtos do beneficiamento de soja indispensáveis ao trabalho, e seu funcionário Marcos Felipe Gerber Wietzkoski, amigo e expert nos assuntos relacionados à leguminosa.

Aos colegas, professores e amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular e Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos, cujos nomes não me lembro na totalidade, sobrenomes desconheço por completo, mas cuja ajuda não me esquecerei e sempre serei grato.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS	03
CAPÍTULO 1: Elaboração e otimização de um meio de cultivo com fontes alternativas para a produção de <i>Bacillus sphaericus</i> Meyer e Neide, 1904.....	05
RESUMO	06
ABSTRACT	06
1. INTRODUÇÃO	07
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Principais bactérias entomopatogênicas.....	10
2.1.1. <i>Bacillus sphaericus</i> Meyer e Neide, 1904.....	10
2.1.2. Mecanismo de ação do cristal protéico.....	10
2.1.3. Especificidade.....	11
2.1.4. Controle da filariose linfática com bioinseticida.....	12
2.1.5. Eficiência no controle da malária.....	12
2.1.6. Tempo de permanência do bioinseticida no ambiente.....	13
2.1.7. Resistência dos mosquitos ao <i>Bacillus sphaericus</i>	13
2.1.8. Manejo da resistência dos insetos à toxina do <i>Bacillus sphaericus</i>	15
2.2. <i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> Say, 1823.....	16
2.2.1. Distribuição.....	16
2.2.2. Comportamento.....	16
2.2.3. Veiculação de patógenos.....	17
2.3. <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> Linnaeus, 1762.....	19
2.3.1. Distribuição.....	19
2.3.2. Comportamento.....	19
2.3.3. Veiculação de patógenos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Local.....	21
3.2. Microrganismo.....	21
3.2.1. Preparo do pré-inóculo	21
3.3. Fontes alternativas de nitrogênio e carbono.....	22
3.4. Criação de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> para bioensaio.....	23
3.4.1. <i>Aedes aegypti</i>	23
3.4.1.1. Manutenção de adultos e produção de ovos.....	23
3.4.2. <i>Culex quinquefasciatus</i>	23
3.4.2.1. Manutenção de adultos e produção de ovos e larvas.....	23
3.5. Bioensaio.....	24
3.6. Análise estatística.....	26
3.7. Otimização de meio de cultivo para <i>Bacillus sphaericus</i>	26
3.7.1. Escolha da fonte de nitrogênio.....	26
3.7.2. Escolha da fonte de carbono.....	27

3.7.3. Determinação da melhor concentração dos compostos.....	27
3.7.4. Determinação do tempo de fermentação.....	27
3.7.5. Determinação do pH inicial.....	27
3.7.6. Quantificação da taxa de inóculo	28
3.8. Suscetibilidade de larvas.....	28
3.9. “Scale-up”.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Escolha da fonte de nitrogênio.....	28
4.2. Escolha da fonte de carbono.....	30
4.3. Determinação da melhor concentração de farelo branco de soja	31
4.4. Determinação do tempo de fermentação.....	32
4.5. Determinação do pH inicial.....	33
4.6. Quantificação da taxa de inóculo.....	34
4.7. Suscetibilidade de larvas.....	34
4.8. “Scale-up”.....	36
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2: Controle biológico de <i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> exercido pelo <i>Bacillus sphaericus</i> cultivado no meio de farelo branco de soja.....	43
RESUMO	44
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Processo de obtenção do farelo branco de soja.....	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Microrganismo.....	48
3.2. Meios de cultivo.....	48
3.3. Bioensaios.....	49
4. RESULTADOS	49
5. DISCUSSÃO	
5.1. Considerações sobre o farelo branco de soja.....	52
5.2. O meio farelo branco de soja e o meio batata.....	53
5.3. Estabilidade do bioinseticida.....	53
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	54

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Derivados de soja testados como fonte de nitrogênio.....	22
Tabela 2: Produtos testados como fonte de carbono.....	22

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Mortalidade de larvas L4 de <i>Culex quinquefasciatus</i> produzida pelo meio de cultivo Luria Bertani e farelo branco de soja.....	49
Tabela 2: Comparação dos custos na elaboração do meio de cultivo referência e o meio proposto.....	51

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Procedimentos do bioensaio.....	25
Figura 2: Mortalidade de larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i> frente ao bioinseticida produzido com quatro diferentes fontes de nitrogênio.....	29
Figura 3: Mortalidade de larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i> frente ao bioinseticida produzido com duas diferentes fontes de carbono.....	30
Figura 4: Mortalidade de larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i> frente ao bioinseticida produzido com quatro diferentes concentrações de farelo branco de soja.....	31
Figura 5: Mortalidade de larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i> frente ao bioinseticida com diferentes tempos de fermentação.....	32
Figura 6: Mortalidade de larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i> frente ao bioinseticida fermentado em quatro diferentes produzido diferentes pH.....	33
Figura 7: Mortalidade de larvas L4 de <i>Culex quinquefasciatus</i> frente ao bioinseticida produzido com três diferentes taxas de inóculo.....	34
Figura 8: Mortalidade de larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> frente ao bioinseticida de <i>Bacillus sphaericus</i>	35
Figura 9: Mortalidade de larvas L4 de <i>Culex quinquefasciatus</i> frente ao bioinseticida de <i>Bacillus sphaericus</i> produzido em biorreator de 2L.....	36

CAPÍTULO 2

Figura 1: Mortalidade de larvas L4 de <i>Culex quinquefasciatus</i> produzida pelo meio de cultivo Luria Bertani e farelo branco de soja.....	50
---	----

INTRODUÇÃO GERAL

Em todo mundo, os mosquitos da família Culicidae são responsáveis por uma série de prejuízos diretos e indiretos à saúde pública. Além do incômodo e irritação que causam ao homem e outros animais, eles podem frequentemente funcionar como vetores de agentes patogênicos. Somente na espécie humana, agentes patogênicos causadores de graves doenças como malária, dengue, febre amarela, filariose e arboviroses são transmitidas durante a prática do hematofagismo desses insetos. Os primeiros relatos da transmissão de patógenos por mosquitos foram feitos por Manson em 1894 quando descobriu microfilárias de *Wuchereria bancrofti* em mosquitos do gênero *Culex* Linnaeus, 1758 e por Ross, 1898 ao estudar malária em pássaros (PESSOA & MARTINS, 1977).

No Brasil, os mosquitos da família Culicidae ocupam uma posição de destaque no que diz respeito a doenças parasitárias e virais. A febre amarela é um dos problemas que historicamente mais influenciou na política de saúde e saneamento desde a segunda metade do século XIX, face à sua gravidade e aos programas econômicos decorrentes das epidemias que ocorriam em importantes centros urbanos. A forma silvestre da doença, que não pode ser erradicada, tem sido, desde então, objeto de intervenções visando seu controle, ao mesmo tempo, que a re-introdução do *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 nas Américas exigiu medidas para impedir sua disseminação (FUNASA, 2002).

Os culicídeos são insetos holometábolos que passam por uma metamorfose implicando em modificações morfológicas ao longo do seu desenvolvimento até a fase adulta. Durante o seu crescimento apresenta as fases de ovo, larva (com 4 ínstaras), pupa e finalmente adulta, aproximadamente de 10-12 dias.

Um dos principais fatores para a grande disseminação desses insetos é a sua alta capacidade de procriação em ambientes urbanos, tornando seu controle ainda mais difícil.

Embora o nosso conhecimento relacionado a essas doenças seja cotidianamente expandido, os dados apontam para um crescimento acelerado no número de casos de doenças que têm como vetores mosquitos da família Culicidae, como, por exemplo, a recente epidemia de dengue no Brasil (FNS, 1998).

Por muitos anos, as campanhas de combate aos mosquitos baseavam-se quase que exclusivamente ao uso do DDT e outros organoclorados tanto para o controle antilarvário quanto à dedetização domiciliar contra os adultos. Inicialmente, os resultados dessa técnica se mostraram bastante satisfatórios, possibilitando, por exemplo, a eliminação de focos de malária na maior parte do território brasileiro. Por outro lado, após algumas décadas, os resultados dessa estratégia se mostraram muito danosos. Além do DDT ser um inseticida químico de alta toxicidade, observou-se um rápido desenvolvimento de resistência fisiológica dos culicídeos, além do efeito negativo com a contaminação do ambiente e de organismos não-alvo. Vale ressaltar que os resíduos acumulados demonstraram ser altamente prejudiciais aos inimigos naturais dos culicídeos e também ao próprio homem.

Frente a esse quadro, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias e do aprimoramento dos programas atuais destinados ao controle da transmissão das enfermidades transmitidas por mosquitos.

Atualmente, cientistas de todo mundo trabalham com formas alternativas de controle de mosquitos de importância médica com a finalidade de implementar um inseticida ambientalmente seguro (HOUGARD & BACK, 1992; FEDERICI, 1995; CHARLES & NIELSEN-LeROUX, 2000; MONNERAT *et al.*, 2004). Dentro desse panorama, o controle biológico exercido por bactérias produtoras de endotoxina, como *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, tem se mostrado eficaz no controle de insetos das Ordens Díptera, Lepidóptera e Coleoptera, atuando somente sobre a fase larval, nunca sobre os adultos (RABINOVITCH *et al.*, 1998). Esses *bacilli* possuem a vantagem de ser seguros aos organismos não-alvo, não cumulativos e, portanto, seguros ao meio ambiente (WHO, 1985).

O *Bacillus sphaericus* é uma bactéria aeróbica gram-positiva que produz um esporo esférico na porção terminal da cápsula bacteriana. Seu efeito larvicida é produzido principalmente a partir de duas toxinas (BIN 1 e BIN 2) que atuam em sinergia. As toxinas apresentam uma alta toxicidade às larvas de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823, o que resulta no sucesso da utilização dos bioinseticidas de *Bacillus sphaericus* para o controle dessa espécie de Culicidae. Além disso, o *Bacillus sphaericus* apresenta a característica de persistir no ambiente por até 60 semanas, se reciclando no tecido de larvas mortas (GANUSHKINA *et al.*, 2000).

No Brasil, bioinseticidas produzidos com o princípio ativo de *Bacillus sphaericus* vêm sendo desenvolvidos e comercializados para o controle biológico de algumas espécies de mosquitos da família Culicidae (SILVA-FILHA *et al.*, 2000). Contudo, é importante ressaltar que melhores resultados podem ser obtidos a partir da implementação de estudos que permitam desenvolver meios de cultivo de baixo custo e elevada concentração de toxinas.

O objetivo do presente trabalho é formular um meio de cultivo de *Bacillus sphaericus* a partir de matérias-primas encontradas na região do Paraná, sul do Brasil, padronizar as condições ideais de crescimento e aferir sua toxicidade frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. O trabalho se divide em dois capítulos, o primeiro com todos os passos que conduziram a elaboração e padronização do meio até sua fermentação em biorreator de 2L, o segundo capítulo confrontando o meio de cultivo com o meio Luria Bertani, uma vez que este é o meio indicado e mais utilizado para o cultivo do microrganismo (SAMBROOK *et al.*, 1989).

REFERÊNCIAS

CHARLES, J.; NIELSEN – LeROUX , C. Mosquitocidal bacterial toxins: Diversity, mode of action and resistance phenomena. *Bacteries et Champignons Entomopathogenes*. Institut Pasteur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95 (Suppl. 1): p. 201-206, 2000.

FEDERICI, B.A. The Future of Microbial Insecticides as Vector Control Agents. **Journal of the American of Mosquito Control Association**. 11(2):260-268, 1995.

FNS – Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em <http://www.fns.gov.br>, (acessado em 03 de abril de 2003).

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, Vigilância Epidemiológica, Plano de Intensificação das Ações e Controle da Febre-Amarela; 2002. Disponível em <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengueO.htm> (acessado em 03 de abril de 2003)

GANUSHKINA, L.A.; LEBEDEVA, N.N.; AZIZBEKYAN, R.R.; SERGIYEV, V.P. The duration of the larvicidal effects of sporocrystalline mass of the bacteria *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the laboratory setting. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. n. 4, p. 25-29, 2000.

HOUGARD, J-M.; BACK, C. Perspectives on the bacteriological control of vectors in the tropics. **Parasitology Today**, v.8, p.364-366, 1992.

MONNERAT, R.; SILVA, S. F.; DIAS, D. S.; MARTINS, E. S.; PRACA, L.B.; JONES, G. W. ; SOARES, C. M. ; DIAS, J.M.C.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Entomology**. 128(7): 469-473, 2004.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 986p, 1977.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS C. F. C.; LIMA, M. M. Dos *Bacillus* entomopatogênicos, o que se espera? **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v.6, p.40-41, 1998.

SILVA-FILHA, M. H.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M.; FURTADO, A. F. **Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil.** Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. - **Molecular cloning - A laboratory Manual.** 2nd ed New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

WHO. **Report of Informal consultation of the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide.** TDR/BVC/*Sphaericus*/85.3 S.l., 23pp, 1985.

CAPÍTULO 1

Elaboração e otimização de um meio de cultivo com fontes alternativas para a produção de *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide,

1904

RESUMO

A padronização de um meio de cultivo para *Bacillus sphaericus* a partir de fontes alternativas testou produtos do beneficiamento da soja como fonte de nitrogênio (farelo, farelo branco, extrato e farinha) e derivados da cana-de-açúcar como fonte de carbono (melaço e açúcar mascavo). Após fermentarem, os meios de cultivo eram aplicados em diferentes diluições a larvas L4 de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, tendo a mortalidade das larvas aferida. Como fonte de nitrogênio, o farelo branco de soja propiciou uma maior mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*. Compostos ricos em carboidratos não resultaram em acréscimo na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* e não demonstraram ser aproveitáveis como fontes de carbono. As larvas de *Culex quinquefasciatus* foram mais suscetíveis ao bioinseticida quando comparadas às larvas de *Aedes aegypti*, numa relação superior a 1:100. Em pequena escala, o melhor desempenho de mortalidade foi propiciado pelo meio composto apenas de farelo branco de soja, concentração de 20g/l, que fermentou por 72h, a 30°C, 120rpm e taxa de inóculo de 5%. A mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* obtida foi de 100% numa diluição de 1/100.000. Em biorreator de 2L, a padronização foi farelo branco de soja, concentração de 40g/l, que fermentou por 72h, 30°C, 200rpm e taxa de inóculo de 10%. A mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* obtida foi de 100% numa diluição de 1/200.000.

Palavras-chaves: Bioinseticida, *Bacillus sphaericus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, farelo branco de soja.

ABSTRACT

The standardization of an alternative culture medium for *Bacillus sphaericus* was performed by testing processed soya bean products as a nitrogen source (flakes, soy protein concentrated, extract, flour) and sugar cane derivatives (syrup and organic mascavo sugar) as a carbon supplement. After fermentation process, different dilution of obtained media were applied on mosquitoes larvae (L4) of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, and mortality rates were verified. High mortality of *Aedes aegypti* larvae was observed by using soy protein concentrated as a nitrogen source. None of the high concentrated carbohydrate compounds showed increase in mortality of *Aedes aegypti* larvae and consequently they were not usable as carbon source. Compared to *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* larvae were more susceptible to the bioinsecticide in a rate greater than 1:100. In a small scale of bioinsecticide production, mortality rate was best observed by using medium based on soy protein concentrated alone, with concentration of 20g/l, fermentation time of 72h at 30°C, rotation of 120rpm and inoculum rate of 5%. At 1/100,000 dilution of the bioinsecticide, mortality of *Culex quinquefasciatus* larvae were 100%. Standardization method for fermentation in 2L bioreactor system was performed using soy protein concentrated with concentration of 40g/l, fermentation time of 72h at 30°C, rotation of 200rpm and inoculum rate of 10%. *Culex quinquefasciatus* larvae mortality of 100% was observed at 1/200,000 dilution of the product.

Keywords: Bioinsecticide, *Bacillus sphaericus*, soy protein concentrated, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*.

1 - INTRODUÇÃO

A veiculação de patógenos através da picada de mosquitos representa uma forma de transmissão muito bem sucedida e adaptada ao estilo de vida do homem. Nesse processo, a adequação dos insetos vetores aos criadouros urbanos foi um passo indispensável para a grande disseminação de muitos organismos parasitas. Doenças como malária, dengue e filariose ocupam até o presente momento uma posição de destaque nas políticas de saúde pública, especialmente em países subdesenvolvidos.

Por muitas décadas, os programas de controle aos mosquitos vetores consistiam em sua maioria na utilização de inseticidas sintéticos, normalmente organoclorados e organofosforados. Produtos como o DDT foram amplamente empregados em todo mundo, alcançando relativo sucesso num primeiro momento. Contudo, após alguns anos de aplicação as más conseqüências dessa estratégia começaram a aparecer. Por apresentar um raio de ação de amplo espectro, a contaminação da cadeia alimentar trouxe seus efeitos nocivos aos organismos não-alvo e, em muitos casos, a intoxicação chegou até o homem (HAYES, 1992).

A descoberta de bactérias entomopatogênicas nas décadas de 50 e 60 abriu uma nova perspectiva aos programas de combate aos mosquitos da família Culicidae. Dentre esses microrganismos, o *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) e o *Bacillus sphaericus* (Bs) apresentaram maior potencial larvicida (RABINOVITCH *et al.*, 1998). Seus produtos apresentam a vantagem de ser ambientalmente seguros, sem efeito cumulativo na cadeia trófica, bastante específicos, não acometendo organismos não-alvo, e inócuos ao homem (WHO, 1985).

O *Bacillus sphaericus* é uma bactéria aeróbica gram-positiva que produz um esporo esférico na porção terminal. Seu efeito larvicida é produzido principalmente a partir de duas toxinas que atuam em sinergia. As toxinas apresentam uma alta toxicidade às larvas de *Culex quinquefasciatus*, o que

resulta no sucesso da utilização dos bioinseticidas de *Bacillus sphaericus* para o controle dessa espécie de Culicidae (SINGER, 1974). Segundo muitos autores, sua aplicabilidade também incluiria mosquitos do gênero *Anopheles* e, sendo assim, podendo ser utilizado nos programas de controle de malária (YAP, 1985; SKOVMAND & SANOGO, 1999; LABIB & DAWOUD, 2003; SELEENA *et al.*, 2004).

Atualmente existem disponíveis no mercado bioinseticidas produzidos a partir de *Bacillus sphaericus*, como Vectolex® e Spherix®, porém deve-se ressaltar que a maioria desses produtos é produzida longe dos locais onde serão aplicados, geralmente países desenvolvidos, e posteriormente exportados. Além de encarecer os custos e, conseqüentemente, limitar sua utilização, muitas vezes o transporte e estocagem inadequada acaba influenciando negativamente na eficiência do produto. Semelhante processo já foi observado com bioinseticidas de Bti no controle de pragas agrícolas, como, por exemplo, alguns lepidópteros (BHUMIRATANA, 1991).

Sendo assim, afim de possibilitar a redução dos custos de produção e possibilitar uma maior agilidade na aplicação, muitos autores têm sugerido a implementação de uma produção local dos bioinseticidas (OBETA & OKAFOR, 1983; BHUMIRATANA, 1991; POLLOM, 2003). Essa produção seria próximo aos locais onde os bioinseticidas são mais necessários, normalmente países tropicais subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, e eliminaria a dependência tecnológica dos países desenvolvidos.

A implementação de uma produção local de bioinseticidas apresenta como vantagem a estabilidade, pois os produtos fermentados localmente não ficam muito tempo estocados ou não precisam viajar grandes trajetos até que possam ser utilizados. Outra vantagem estaria na formulação, pois os bioinseticidas comerciais nem sempre são formulados a partir de um estudo amplo ou testados suficientemente (BHUMIRATANA, 1991). Dessa forma, podem ser melhorados a partir de mais ensaios biológicos testando formulações diversas.

Outro fator importante são as diferenças locais. Muitas vezes, as padronizações atingidas são mais apropriadas para uma dada região com

características particulares. Tais características não são obrigatoriamente as mesmas do local onde os produtos serão usados. Os resultados, muitas vezes, são bastante inferiores, haja vista que os bioinseticidas são produzidos em países desenvolvidos, normalmente de clima temperados, e geralmente aplicados em locais tropicais com ambientes distintos (BHUMIRATANA, 1991).

Dentro desse panorama, o cultivo de *Bacillus sphaericus* (Bs) adequa-se bem a realidade brasileira. O Bs é uma bactéria que não necessita de condições especiais para se desenvolver, sendo de simples manuseio. Apresenta um crescimento aeróbico que não necessita de um sistema de aeração especial, alcançando bons resultados a partir de uma fonte de ar comum (YOUSTEN *et al.*, 1984). Além disso, a imensa variedade de recursos naturais possibilita a formulação de meios de cultivo bacteriano a um baixo custo e alta produtividade mantendo-se a qualidade.

Em todo mundo, diversos produtos agrícolas empregados no cultivo de *Bacillus sphaericus* já foram testados com sucesso, usando como base sementes e extratos de legumes. Além das qualidades nutricionais, o custo da matéria-prima é importante para que se consiga reduzir o preço final. Outro fator importante é que a matéria-prima empregada seja disponível e de fácil aquisição. Todas essas características fizeram dos derivados da soja, um produto abundante no Estado do Paraná, a fonte alternativa preterida neste trabalho.

POLLOM (2003) obteve resultados de 100% de mortalidade de larvas em ínstar L4 de desenvolvimento de *Aedes aegypti* usando um bioinseticida a partir de Bti produzido com derivados de soja como fonte de nitrogênio e melado de cana como fonte de carbono. Porém, não existem dados referentes ao uso destes produtos em fermentações em pequena e grande escala para a produção de *Bacillus sphaericus*. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivos:

1. Otimizar um meio de cultivo de alta produtividade de *Bacillus sphaericus*.
2. Determinar o grau de toxicidade do produto contra larvas do quarto ínstar (L4) de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, aferindo a concentração ideal para uma maior eficiência.

3. Fermentar em biorreator de 2L um meio de cultivo de alta produtividade de *Bacillus sphaericus* com alto potencial larvicida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Principais bactérias entomopatogênicas

As duas espécies de bactérias entomopatogênicas mais estudadas e utilizadas como bioinseticidas são o *Bacillus thuringiensis israelensis* e o *Bacillus sphaericus* (RABINOVITCH *et al.*, 1998). Ambas produzem endotoxinas protéicas, as quais, quando ingeridas pelas larvas de insetos atacam e destroem o seu epitélio do estômago (intestino médio), levando à morte. *Bacillus thuringiensis israelensis* é eficaz contra espécies do gênero *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e até certo ponto contra *Mansonia*, sendo ainda ativo contra larvas de simulídeos. *Bacillus sphaericus* mostrou-se especialmente eficaz contra larvas de *Culex* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

2.1.1. *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide, 1904

Bacillus sphaericus é uma bactéria aeróbica que produz um esporo esférico na porção terminal da célula (DAVIDSON, 1988). O efeito larvicida é produzido a partir de dois tipos de proteínas: os cristais e as toxinas Mtx. Ambas apresentam composições distintas e tempos de síntese diferenciados. Os cristais são os principais responsáveis pela alta atividade larvicida e sua liberação está associada ao processo de esporulação da bactéria. Porém, evidências recentes apontam para um papel importante das toxinas Mtx na toxicidade contra larvas de diferentes espécies de culicídeos (SHI *et al.*, 2003; PROMDONKOY *et al.*, 2004).

2.1.2. Mecanismo de ação do cristal protéico

O cristal é formado por dois polipeptídeos, Bin 1 (41,9 kDa) e Bin 2 (51,4 kDa). Ambos atuam de maneira sinérgica, isto é, uma potencializando o efeito

larvicida da outra, sendo que Bin 1 é mais tóxica. A endotoxina binária funciona ativando receptores livres da camada unilamelar e da bicamada lipídica através da formação de poros. O processo é favorecido pelo pH alcalino do trato digestivo da larva associado com a presença de ácidos lipídicos (SCHWARTZ *et al.*, 2001).

Além disso, o *Bacillus sphaericus* apresenta a característica de multiplicação bacteriana na hemolinfa, causada pela germinação do esporo e determinando um processo septicêmico (RABINOVITCH *et al.*, 1998). A associação do dano tecidual com o quadro septicêmico propicia uma alta toxicidade às larvas susceptíveis.

LABIB & DAWOUD (2003) estudaram a ação citopatológica em larvas de três diferentes espécies de Culicidae após a ingestão do complexo esporo/cristal do *Bacillus sphaericus*. O trabalho comprovou os diferentes efeitos citotóxicos nas larvas gerados a partir do uso de bioinseticida de *Bacillus sphaericus*. Observou-se que 24h após a ingestão, as bactérias passavam por um período germinativo, isto é, multiplicando-se no lúmen do trato digestivo da larva. Entre 36 e 48h, as larvas apresentavam mudanças ultraestruturais no trato digestivo conforme a espécie. Em *Anopheles (Anopheles) pharoensis* Theobald, 1901 a mucosa intestinal se encontrava dilatada com deformações no retículo endoplasmático rugoso, as mitocôndrias estavam excessivamente aumentadas. Em *Culex (Culex) pipiens* Linnaeus, 1758, grandes vacúolos apareceram por todo trato digestivo, sendo que o retículo endoplasmático liso fragmentou-se em pequenas vesículas. O trato digestivo de *Aedes (Ochlerotatus) caspius* Edwards 1920 também apresentou mitocôndrias aumentadas e grandes vacúolos foram observados no retículo endoplasmático liso.

2.1.3. Especificidade

Apesar da alta toxicidade, o *Bacillus sphaericus* possui um raio de ação bastante restrito, acometendo apenas um pequeno número de espécies susceptíveis. Enquanto o *Bacillus thuringiensis israelensis* é considerado um bioinseticida de amplo espectro, apresentando toxicidade contra larvas de lepidóptero, simulídeos e culicídeos, o *Bacillus sphaericus* é muito mais seletivo,

geralmente atuando contra larvas de mosquito do gênero *Culex* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

BROWN *et al.* (2004) avaliaram a aplicação de Vectolex®, bioinseticida produzido a partir de *Bacillus sphaericus*, na Austrália. Após a utilização do produto contra larvas de diversas espécies de mosquitos, comprovou-se uma maior susceptibilidade das espécies do gênero *Culex*. Comparadas com espécies não-alvo, como *Aedes (Ochlerotatus) vigilax* Skuse, 1889 e *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762, o *Culex* spp. foi de 10 a 100 vezes mais vulnerável ao produto. Além da segurança às espécies não-alvo, pôde-se constatar que o bioinseticida de *Bacillus sphaericus* não afetou os peixes ou a qualidade da água.

2.1.4. Controle da filariose linfática usando bioinseticida

A especificidade do *Bacillus sphaericus* possibilita o controle de determinados mosquitos sem afetar espécies não-alvo. Normalmente sua aplicação é amplamente destinada ao controle de *Culex quinquefasciatus*, devido a sua participação no ciclo da filariose e arboviroses (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

MULLA *et al.* (2001) notificaram os bons resultados da aplicação do *Bacillus sphaericus* no controle de *Culex quinquefasciatus* na Tailândia. Eles observaram uma grande diminuição no número de larvas que antecedeu um substancial declínio na densidade de adultos. No período de 7 a 14 dias foi observado o máximo declínio do número de adultos. Durante 2.000 testes realizados em Wat Pikul, observou-se uma redução de 87-98% de adultos em aplicações de maior concentração do produto.

SILVA-FILHA *et al.* (2001) comprovaram resultados consistentes da aplicação de *Bacillus sphaericus* no controle de *Culex quinquefasciatus* por três anos em Recife. Foi observada uma redução significativa no número de larvas nos locais onde o produto era aplicado, principalmente a partir do segundo ano. Os resultados se mantiveram no ano subsequente, quando a densidade de adultos permaneceu baixa mesmo na ausência de tratamento.

2.1.5. Eficiência no controle da malária

Além da eficiência já comprovada do *Bacillus sphaericus* no controle do vetor da filariose linfática, trabalhos recentes vêm mostrando a aplicabilidade do bioinseticida no controle dos vetores da malária. FILLINGER *et al.* (2003) relataram resultados satisfatórios da aplicação de *Bacillus sphaericus* no combate a larvas de *Anopheles gambiae*, responsável pela transmissão da malária no Quênia.

Semelhante aplicação também foi relatada por SELEENA *et al.* (2004), que relataram a associação de bioinseticidas e inseticidas químicos no controle do *Anopheles balabacensis*, vetor da malária na Malásia. Enquanto inseticidas químicos à base de alfa cipermitina eram usados para o controle dos insetos adultos, os bioinseticidas eram aplicados para o controle anti-larvário. Os resultados dessa estratégia se comprovaram no ano seguinte, quando foi registrada uma redução significativa no número de casos de malária nos locais nas cidades tratadas durante o estudo.

2.1.6. Tempo de permanência do bioinseticida no ambiente

Outra característica importante dos bioinseticidas formulados a partir de *Bacillus sphaericus* é a capacidade de se reciclar no corpo de larvas mortas de Culicidae, persistindo muito mais tempo no ambiente. GANUSHKINA *et al.* (2000) afirmaram que o tempo de persistência depende principalmente da concentração em que o produto é aplicado. A presença de larvas mortas estenderia o efeito larvicida por até 60 semanas.

LABIB & MOHAMAD (2003) estudaram o processo de reciclagem de *Bacillus sphaericus* em larvas de *Culex pipiens* e *Anopheles pharoensis*, monitorando a atividade microbiana. Observou-se que o número de esporos viáveis começou a decair 12h após a ingestão, alcançando valores máximos de 12h a 24h. Nos cadáveres, o número de células bacterianas começou a crescer após o primeiro e segundo dia, atingindo o ápice uma semana depois, quando chegou a ser 20 vezes maior do que a quantidade ingerida.

2.1.7. Resistência dos mosquitos ao *Bacillus sphaericus*

Apesar da grande eficiência no controle de mosquitos do gênero *Culex* e outras espécies, rapidamente foi observado o desenvolvimento de resistência contra a toxina do *Bacillus sphaericus*. Sucessivas aplicações do produto formariam, com o passar do tempo, gerações de insetos resistentes ao bioinseticida. O mecanismo molecular dessa resistência e a forma de transmissão dessa herança foi tema de uma série de trabalhos recentes.

OLIVEIRA *et al.* (2004) estudaram os mecanismos moleculares da resistência do *Culex quinquefasciatus* ao bioinseticida de *Bacillus sphaericus*. Foi constatado que a resistência dos insetos coletados no Brasil e na China era resultado de uma modificação no receptor presente na mucosa da larva que reconhece o cristal BIN 2. Esse receptor alterado não reconheceria o peptídeo do *Bacillus sphaericus* perdendo assim o efeito citopático no trato digestivo da larva. O estudo revelou ainda que a herança é recessiva e autossômica.

Uma conclusão parecida foi atribuída a NIELSEN-LeROUX *et al.* (2002), que avaliaram a resistência à toxina do *Bacillus sphaericus* em *Culex pipiens* procedentes de países do oeste do Mediterrâneo. Também foi observado que a resistência era resultado de uma alteração no receptor para o peptídeo Bin 2 do cristal. Porém, a herança seria transmitida de forma recessiva de um gene não-autossômico.

Problemas no receptor para Bin 2 também foram detectados em SILVA-FILHA *et al.* (2004), estudando colônias resistentes de *Culex pipiens*. Dessa vez, porém, foi observada a perda completa desse receptor nas membranas do trato digestivo da larva. Além disso, o receptor para Bin 1 também se mostrou falho em colônias que apresentavam resistência a outra cepa do microrganismo. Foi demonstrado, então, que os mecanismos de resistência podiam ter uma explicação nos dois receptores para a endotoxina do *Bacillus sphaericus*.

Estudando colônias de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Bacillus sphaericus* na Índia, POOPATHI *et al.* (2002) afirmaram que não há quaisquer diferenças significativas nos instares larvais, tempo de vida dos adultos ou quantidade de ovos. A biologia desses insetos resistentes não diferia dos demais.

OLIVEIRA *et al.* (2003), compararam colônias susceptíveis com resistentes e concluíram que as colônias resistentes apresentam menor fecundidade e fertilidade. Além disso, elas teriam um tempo maior de desenvolvimento do que colônias susceptíveis.

2.1.8. Manejo da resistência dos insetos à toxina do *Bacillus sphaericus*

Apesar do desenvolvimento de resistência ao *Bacillus sphaericus* ser freqüentemente observado nos programas de controle anti-larvário, trabalhos recentes mostram que diferentes estratégias podem facilmente reverter a resistência e dar prosseguimento aos programas de controle. Sendo assim, os bioinseticidas de *Bacillus sphaericus* continuam sendo uma excelente ferramenta para o controle de vetores de agentes patogênicos.

POOPATHI *et al.* (2003) constataram que a resistência ao *Bacillus sphaericus* não implica em resistência aos inseticidas químicos. Aplicando Malathion, inseticida organofosforado, sobre larvas de uma população de *Culex quinquefasciatus* resistentes obtiveram a mesma eficácia observada em larvas susceptíveis. Seus resultados indicariam o uso do inseticida químico no manejo de mosquitos resistentes ao *Bacillus sphaericus*.

Outra estratégia bem sucedida foi notificada aplicando bioinseticidas de *Bacillus thuringiensis israelensis*. YUAN *et al.* (2003) constataram não haver resistência cruzada entre os dois bioinseticidas testando *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Bacillus sphaericus*.

PEI *et al.* (2002) submeteram duas colônias de *Culex quinquefasciatus* a três cepas de *Bacillus sphaericus*. Observou-se resistência a partir de 13-18 gerações nas cepas C3-41 e IAB59, 46 gerações para a cepa 2362. Em todos os casos, não foi verificado resistência ao *Bacillus thuringiensis israelensis* por parte das larvas resistentes. POOPATHI *et al.* (2001) obtiveram o mesmo

resultado aplicando *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de uma população muito resistentes a cepa 2362 de *Bacillus sphaericus*.

ZAHIRI *et al.* (2002 e 2003) testaram com sucesso uma formulação com a mistura de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis israelensis* em um colônia resistente a cepa 2362. Após 36 gerações não havia ainda observado resistência, sendo que bastariam 15 gerações para o desenvolvimento de resistência ao *Bacillus sphaericus* isoladamente.

Mais recentemente, ZAHIRI *et al.* (2004) obtiveram resultados satisfatórios com uma cepa recombinante de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis israelensis* contra larvas de *Aedes aegypti* e larvas de uma população resistentes a cepa 2362 de *Bacillus sphaericus*. A bactéria recombinante produzia as duas endotoxinas, o que ampliava o seu potencial larvicida.

2.2. *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823

O *Culex quinquefasciatus* é um mosquito amplamente distribuído no mundo com o potencial vetorial de agentes causadores de doenças humanas e veterinárias. Além do já conhecido papel na veiculação da *Wuchereria bancrofti*, agente causador da filariose linfática, segunda maior doença parasitária em número de casos, mais recentemente tem sido amplamente estudado devido ao papel na transmissão do Vírus do Oeste do Nilo. Este inseto está inteiramente adaptado aos ambientes urbanos, o que lhe confere a capacidade de carrear agentes patogênicos silvestres, como arboviroses, aos aglomerados populacionais. Sendo assim, o combate a esses mosquitos se faz necessário por uma questão de saúde pública.

2.2.1. Distribuição

O *Culex quinquefasciatus* é considerado trópico-cosmopolita, isto é, amplamente difundindo nas regiões de clima tropical e subtropical ao redor do mundo. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Ocorre, basicamente, nas porções meridionais da Ásia, na África, nas Américas (do sul dos Estados Unidos ao

norte da Argentina) e na Oceania. Em todas essas áreas, a presença do inseto pode ser relacionada diretamente com a incidência da filariose linfática (WHO, 2006).

2.2.2. Comportamento

O *Culex quinquefasciatus* pode se desenvolver tanto em criadouros naturais quanto artificiais, desde que ambos estejam associados à presença humana, como em ambientes peridomiciliares. Na natureza podem se desenvolver no solo ou recipientes ricos em matéria orgânica em decomposição, muitas vezes de aspecto sujo e mal cheiroso. Em recipientes artificiais, geralmente sombreados, como vasilhames, latas, copos ou bebedouros de animais são muito procurados para a desova e criação do culicídeo (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

São mais freqüentes nos meses quentes e chuvosos, favorecidos pelo acúmulo de água no solo e nos recipientes, mesmo assim pode ser coletado durante todo ano, ininterruptamente (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A atividade hematofágica do *Culex quinquefasciatus* é preferencialmente noturna. Apesar de fêmeas e machos normalmente invadirem habitações humanas permanecendo durante todo dia e noite, preferem praticar a hematofagia nas horas mais avançadas da noite e os momentos que antecedem o amanhecer (PESSOA & MARTINS, 1977).

É altamente antropofílico, procurando o homem dentro de sua habitação para exercer o hematofagismo. Portanto, além de veiculadores de agentes patogênicos são insetos que molesta o homem e os animais com suas picadas. Porém, existe nesses mosquitos uma certa ornitofilia, pois, após o homem, são as aves domésticas as mais atacadas pelas fêmeas. Além disso, em condições experimentais, verificou-se uma considerável saurofilia, algo que ampliaria ainda mais a gama de hospedeiros (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Mesmo assim, quando o homem está presente é ele o alvo preferencial do *Culex quinquefasciatus*.

2.2.3. Veiculação de patógenos

O *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor da *Wuchereria bancrofti*, agente causador de 90% dos casos de filariose linfática. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a filariose é uma doença endêmica em 80 países, principalmente na América do Sul, África e Ásia, onde vivem aproximadamente 1,1 bilhão de pessoas em áreas de risco. Atualmente, estima-se que há aproximadamente 120 milhões portadores de filariose linfática, segunda maior doença parasitária em número de casos, só superada pela malária (WHO, 2006).

Sua predileção pelo sangue humano e sua preferência por sugar durante a noite facilitam muito o contato das microfilárias com este culicídeo. Isso porque o homem é o único hospedeiro da *Wuchereria bancrofti* e durante a noite ocorre um aumento da microfilaremia periférica. A associação desses dois eventos torna o *Culex quinquefasciatus* um vetor mais eficaz que os outros mosquitos susceptíveis.

No Brasil, a situação mais caótica da filariose linfática se encontra no Estado de Pernambuco. Estudos mostraram que em alguns bairros de Recife e Olinda a prevalência de indivíduos microfilarêmicos atinge índices superiores a 10%. Segundo ROCHA & FONTES (1998), isso mostra que passados mais de 40 anos dos primeiros levantamentos, as taxas de prevalência estão maiores que as descritas no passado em Recife. A manutenção da bancroftose endêmica em Recife está certamente associada com a baixa qualidade de vida na maioria da área urbana do município, realçada pela migração desordenada (urbanização), pelo grande número de favelas e saneamento precário na cidade que favorecem a proliferação do mosquito vetor.

Além da filariose, o *Culex quinquefasciatus* também pode atuar como vetor de arboviroses como, por exemplo, o vírus do Oropouche e encefalites do tipo St. Louis e Venezuelana (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Dentro do grupo das encefalites, destaca-se a Febre do Oeste do Nilo. A doença é causada pelo flavivírus *West Nilo virus* (WNV), encontrado naturalmente em aves e descrito no ano de 1937, em Uganda. Em humanos, porém, é responsável por uma forma severa de encefalite, podendo resultar em óbito (FIOCRUZ, 2006).

O vírus nunca havia sido registrado nas Américas até 1999, quando foi responsável por seis mortes em Nova York naquele ano (SPIELMAN *et al.*, 2004). Atualmente, diversos estudos têm comprovado a presença do WNV em diferentes animais. Conforme BLITVICH *et al.* (2003), os equinos podem funcionar como reservatórios e desenvolver o quadro de encefalite, chegando a óbito. KIENK *et al.*, 2004 comprovaram que a viremia pode ser sustentada e transmitida por crocodilos. Atualmente, um consórcio envolvendo Estados Unidos, Venezuela, Porto Rico e Brasil faz o monitoramento das aves migratórias que podem introduzir o WNV na América do Sul (WHO, 2006). Além disso, segundo especialistas algumas espécies de mosquitos que foram encontradas com o vírus no sul dos Estados Unidos são freqüentes em áreas urbanas na América do Sul (FIOCRUZ, 2006).

2.3. *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762

O *Aedes aegypti* é um mosquito amplamente distribuído no mundo com o potencial vetorial de agentes de doenças causadores de doenças humanas. No final do XIX, o *Aedes aegypti* foi responsável por uma grande epidemia de febre amarela no Brasil, sendo duramente combatido no início do século XX até ser considerado extinto anos depois. Após ser reintroduzido, passou a ser o responsável por veicular o dengue.

2.3.1. Distribuição geográfica

Embora oriundo do Velho Mundo, o *Aedes aegypti* acompanhou o homem ao longo da história. Hoje é considerado um mosquito trópico-cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente entre 45° latitude Norte e 35° latitude Sul ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20°C (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

2.3.2. Comportamento

Seus criadouros são preferencialmente os recipientes artificiais, tanto os abandonados pelo homem a céu aberto e preenchidos pelas águas da chuva, como

aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico (PESSOA & MARTINS, 1977). A única condição é que a água armazenada seja limpa, isto é, não turva, pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais. Além disso, há uma preferência por locais sombreados e de fundo ou paredes escuras.

No Brasil, o *Aedes aegypti* tem sido surpreendido criando-se em recipientes naturais como bromélias usadas com o fim ornamental, buracos em árvores, escavação em rocha e bambu. Contudo, tais encontros são muito raros em comparação com os criadouros preferenciais (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O *Aedes aegypti* tem sua densidade populacional diretamente influenciada pela presença de chuvas. Embora possa manter uma população considerável durante as estações menos chuvosas, a custa de criadouros semipermanentes e independentes da chuva (caixas d'água, cisternas e latões). Porém, é durante a estação chuvosa que sua população realmente alcança níveis elevados e de importância para fins de transmissão de patógenos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

As fêmeas de *Aedes aegypti* restringem seus hábitos hematófagos aos horários diurnos. Seus picos de maior atividade acham-se, geralmente, situados no amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, mas ataca o homem, e por vezes animais domésticos, a qualquer hora do dia (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Observa-se que o *Aedes aegypti* é dotado de um certo ecletismo em relação à fonte sanguínea para alimentação, mas o homem é sua principal vítima. Ataca animais das mais diversas categorias, desde que estejam próximos a seus criadouros e abrigos. Como, no Brasil, tais locais acham-se quase sempre no domicílio ou em sua imediata vizinhança, é o homem o hospedeiro mais visado por esse Culicidae (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

2.3.3. Veiculação de patógenos

No Brasil, *Aedes aegypti* foi o único vetor conhecido de febre amarela urbana e é o único transmissor do dengue, em nossos dias. A febre amarela,

embora, causada por um mesmo tipo de arbovírus (um flavivírus) pode se manifestar de duas formas: Febre Amarela Silvestre e Febre Amarela Urbana (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A forma silvestre é veiculada na floresta por mosquitos silvestres que picam animais susceptíveis ao vírus, especialmente macacos, sendo o homem um hospedeiro acidental. Por outro lado, a forma urbana da febre amarela é veiculada dentro das cidades e vilas, de homem para homem, pelo *Aedes aegypti*.

A febre amarela urbana foi considerada extinta do país desde 1942, quando ocorreram seus últimos casos. Sua última epidemia na América, produzida a custa do *Aedes aegypti*, aconteceu em 1929. Por outro lado, pouco após sua reintrodução no Brasil, o mosquito iniciou uma progressiva e alarmante propagação do dengue (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A epidemiologia do dengue no Brasil, pelo aspecto entomológico, em tudo se assemelha à da febre amarela urbana, sua atual distribuição coincide com a do *Aedes aegypti*. Tanto na febre amarela urbana como na dengue há transmissão transovariana do vírus, de maneira que, variável percentual de fêmeas filhas de um espécime infectado, nasce já infectada (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL

As atividades desenvolvidas no trabalho foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Nesse local eram mantidas a criação de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e onde eram realizados os bioensaios. As fermentação em pequena e grande escala eram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos, também da Universidade Federal do Paraná.

3.2. MICRORGANISMO

O microrganismo usado no presente trabalho é o *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide, 1904, (cepa 2362) procedente do Instituto Pasteur de Paris. O material foi conservado em pequenas alíquotas de 4ml contendo o meio

referência Luria Bertani (SAMBROOK *et al.*, 1989) conservadas em freezer a uma temperatura de -20° C.

3.2.1. Preparo do pré-inóculo

A partir do material bacteriano liofilizado, inoculou-se em meio Nutrient Broth e incubou-se por 24h em estufa a 37°C. Em seguida, o meio fermentado era passado para o ágar Nutriente, onde foi plaqueado. Após fermentar por 24h em estufa a 37°C, as colônias foram plaqueadas e inoculavam um Erlenmeyer contendo 100ml do meio de cultivo Luria Bertani (LB). O pré-inóculo foi fermentado em incubadora rotativa por 72h a 120rpm, 30°C. O meio fermentado, que serviria de pré-inóculo, era adicionado em pequenas alíquotas de 3ml juntamente com 1ml de glicerol 10%, que eram estocadas no freezer a -20°C até seu uso.

3.3. Fontes alternativas de nitrogênio e carbono

Sabendo que POLLON (2003) alcançou uma mortalidade de 100% contra larvas de *Aedes aegypti* usando derivados de soja e melado de cana compondo um meio de cultivo para *Bacillus thuringiensis*, buscou-se semelhante resultado com *Bacillus sphaericus*. Para tanto, foram testados através de bioensaios alguns produtos do beneficiamento da soja como fonte de nitrogênio (Tabela 1).

TABELA 1 – DERIVADOS DE SOJA TESTADOS COMO FONTE DE NITROGÊNIO

PRODUTO	CARACTERÍSTICA
Extrato de soja	Grãos selecionados, lavados e triturados. Recebe a adição de polpa de frutas e açúcares. Direcionado ao consumo humano em forma de leite de soja
Farelo de soja	Grãos de soja descascados, moídos e tratados para extração do óleo de soja. Usado como ingrediente para ração animal.
Farinha de soja	Adequação do farelo de soja destinado ao consumo humano.
Farelo branco de soja	Farelo de soja desengordurado, sem lipídeos, sem carboidratos totais e enriquecido com 65% de proteína.

Como fonte de carbono, outros produtos foram testados como matéria-prima para o cultivo de *Bacillus sphaericus* (Tabela 2).

TABELA 2 – PRODUTOS TESTADOS COMO FONTE DE CARBONO PARA *Bacillus sphaericus*

PRODUTO	CARACTERISTICAS
Melaço de cana-de-açúcar	Sub-produto da fabricação do açúcar e matéria-prima na fabricação de álcool combustível
Açúcar mascavo	Feito a partir de cristais de açúcar obtidos do xarope de melaço

3.4. CRIAÇÃO DE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus* PARA BIOENSAIO

3.4.1. *Aedes aegypti*

3.4.1.1. Manutenção de adultos e produção de ovos e larvas

Larvas de *Aedes aegypti* foram usadas nos bioensaios e a criação foi iniciada a partir de ovos provenientes de uma colônia referência do Instituto Pasteur de Paris.

A criação iniciou-se a partir dos ovos, que eram mantidos durante a fase larval em potes com água. A alimentação do período larval era efetuada a partir de ração de peixe (Alcon®), que era acrescida aos potes diariamente. Quando atingiam o estágio de pupa, os indivíduos eram transferidos para pequenos potes com água mantidos em gaiolas cúbicas (25cm x 25cm) forradas com tela. Após a emergência, adultos eram alimentados por repastos sanguíneos semanais, com a introdução de camundongos recém-natos no interior da gaiola. Para a ovoposição das fêmeas eram colocados papéis de filtro apoiados em copos de plásticos (5cm x 6cm) com água. Estes papéis, contendo os ovos, eram retirados semanalmente, secos à temperatura ambiente e acondicionados em ambiente protegido da umidade, hermeticamente fechados até o momento de serem usados. Quando

eram necessárias grandes quantidades de larvas, os ovos eram imersos em água para que ocorresse a incubação e eclosão.

3.4.2 *Culex quinquefasciatus*

3.4.2.1 Manutenção de adultos e produção de ovos e larvas

Larvas de *Culex quinquefasciatus* foram usadas nos bioensaios e a criação foi iniciada a partir de larvas provenientes de uma colônia referência do IBEX do Rio de Janeiro.

A criação iniciou-se a partir das larvas, que eram alimentadas diariamente com ração de peixe (Alcon®). Quando atingiam o estágio de pupa, os indivíduos eram colocados em pequenos potes com água guardados em gaiolas cúbicas (25cm x 25cm) forradas com tela. Os adultos eram alimentados com repastos sanguíneos semanais. A ovoposição era realizada no interior de copinhos de plásticos com água. As “jangadas” de ovos eram transferidas para potes com água e mantidos em estufa a 27°C até a eclosão.

3.5 BIOENSAIO

Os bioensaios constituem a principal parte do presente trabalho. Todas as decisões tomadas durante a padronização do meio tinham origem resultados dos bioensaios. Essa postura foi adotada graças a característica inerente dos meios utilizados, elaborados com ingredientes insolúveis resultando em um meio de cultivo extremamente particulado. Por apresentar essa característica, não foi possível realizar cinéticas de crescimento por peso seco ou densidade ótica, como é feito na maioria dos trabalhos que envolvem fermentações. Por outro lado, os resultados obtidos oriundos dos bioensaios apresentam a vantagem de ser inteiramente confiáveis, já que quantificam diretamente a eficiência do produto através da real aplicação dos bioinseticidas.



Figura 1: Procedimentos do bioensaio, 1- pote com 90ml de água recebe 20 larvas, 2- Aplicação do bioinseticida diluído, 3- aferição de mortalidade após 48h.

O bioensaio era realizado em potes que recebiam dosagens diferentes do bioinseticida fermentado. Inicialmente, dilui-se 2 gramas do fermentado bruto em 200ml de água, obtendo-se uma diluição de 1/100. Retirando-se 10ml desse conteúdo e misturando a 90ml de água, obtinha-se a diluição de 1/1.000, e assim sucessivamente. Em cada pote, eram depositadas 20 larvas de 4º instar num volume de 90ml de água, as larvas podiam ser de *Aedes aegypti* ou *Culex*

quinquefasciatus, dependo de teste. Os potes recebiam o acréscimo de 10ml do produto diluído, completando um volume total de 100ml. Sendo assim, se o pote contendo 90ml de água recebesse 10ml do produto diluído a 1/100, obtinha-se a diluição de 1/1.0000. Em cada diluição eram feitos outros dois potes com repetição para aumentar a amostra. Dois potes contendo o mesmo número de larvas ainda eram usados como controle, isto é, sem receber qualquer dosagem do produto. Nos experimentos com *Culex quinquefasciatus*, os potes recebiam uma dosagem diária de alimento. Após 48h, a mortalidade das larvas era aferida e determinada quantitativamente a eficácia do bioinseticida. Se a mortalidade das larvas dos potes controle ficasse entre 5 e 20%, era aplicada a fórmula de correção de Abbott (1925). Sendo assim, nos resultados de mortalidade apresentados no trabalho não trarão as taxas de mortalidade dos potes controle, pois estes são levados em consideração na fórmula de correção de Abbott. Caso a taxa de mortalidade do grupo controle atingisse valores superiores a 20%, todo experimento era anulado e repetido.

$$\text{Correção de Abbott:} = \frac{\text{teste de mortalidade} - \text{mortalidade do controle (\%)}}{100 - \text{mortalidade do controle (\%)}} \times 100$$

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados e passavam pela Análise de Variância (ANOVA) com 95% de intervalo de confiança. Posteriormente eram transformados em gráficos com auxílio do programa Excel, Microsoft.

3.7. OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA *Bacillus sphaericus*

3.7.1. Escolha da fonte de nitrogênio

A padronização em pequena escala do meio de cultivo com *Bacillus sphaericus* utilizou como base o meio de cultivo que POLLON (2003) utilizou para produzir *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, composto de farelo de soja 20g/l e melão 2g/l.

O primeiro bioensaio foi um teste qualitativo que visava determinar-se qual seria o composto que, funcionando como fonte de nitrogênio, propiciaria uma maior mortalidade de larvas L4 de *Aedes aegypti*. Para tanto, foram testados quatro produtos do beneficiamento da soja: a farinha, o extrato, o farelo e o farelo branco.

3.7.2. Escolha da fonte de carbono

O segundo teste qualitativo teve como finalidade determinar a fonte de carbono do meio de cultivo para *Bacillus sphaericus*. Para tanto, foram fermentados meios utilizando os seguintes compostos: melaço de cana-de-açúcar e açúcar mascavo. Além disso, para se aferir a importância dos carboidratos na fermentação, preparou-se um meio de cultivo que não recebeu qualquer composto dessa origem. O produto da fermentação foi testado contra larvas L4 de *Aedes aegypti*.

3.7.3. Determinação da melhor concentração dos compostos

Após os testes qualitativos que determinaram os compostos melhor empregados como fonte de nitrogênio e carbono, restava saber qual seria a concentração mais adequada às fermentações de *Bacillus sphaericus*. Neste teste quantitativo, foram empregadas quatro concentrações distintas para aferir quais as quantidades mínimas dos compostos que propiciaria maior mortalidade de larvas L4 de *Aedes aegypti*.

3.7.4. Determinação do tempo de fermentação

O período de fermentação foi determinado através de um bioensaio utilizando o meio com diferentes tempos de fermentação aplicados sobre larvas L4 de *Aedes aegypti*. Foram utilizados os intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação.

3.7.5. Determinação do pH inicial

Com a padronização dos meios de cultivo concluída, isto é, com os compostos definidos e quantidades ajustadas, o passo seguinte foi determinar qual seria o pH inicial do meio mais adequado para as fermentações de *Bacillus sphaericus*, propiciando maior mortalidade de larvas L4 de *Aedes aegypti*. Foram testados os seguintes valores de pH: 6,5; 6,8; 7,0 e 7,2 corrigidos com adição de NaOH.

3.7.6. Quantificação da taxa de inóculo

Para que se garanta uma boa fermentação e conseqüente produção satisfatória de microrganismos e endotoxina, é indispensável a utilização de uma boa quantidade de células como inóculo. No sexto bioensaio, diferentes taxas de inóculo foram testadas como o intuito de descobrir a quantidade suficiente para obter-se maior percentagem de mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* a partir do bioinseticida de *Bacillus sphaericus*. Foram testados três valores como taxa de inoculo: 2%, 5% e 10% do volume final.

3.8. SUSCETILIDADE DE LARVAS

Embora a literatura relate que *Bacillus sphaericus* seja mais eficiente para o controle de *Culex quinquefasciatus*, enquanto que *Bacillus thuringiensis* é mais indicado para o controle de *Aedes aegypti*, dados quantitativos dessa relação são bastante escassos (SINGER, 1974; BHUMIRATANA, 1991, CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Este bioensaio teve a finalidade de determinar quantitativamente a suscetibilidade dessas duas espécies de Culicidae frente ao bioinseticida de *Bacillus sphaericus*.

3.9. “SCALE-UP”

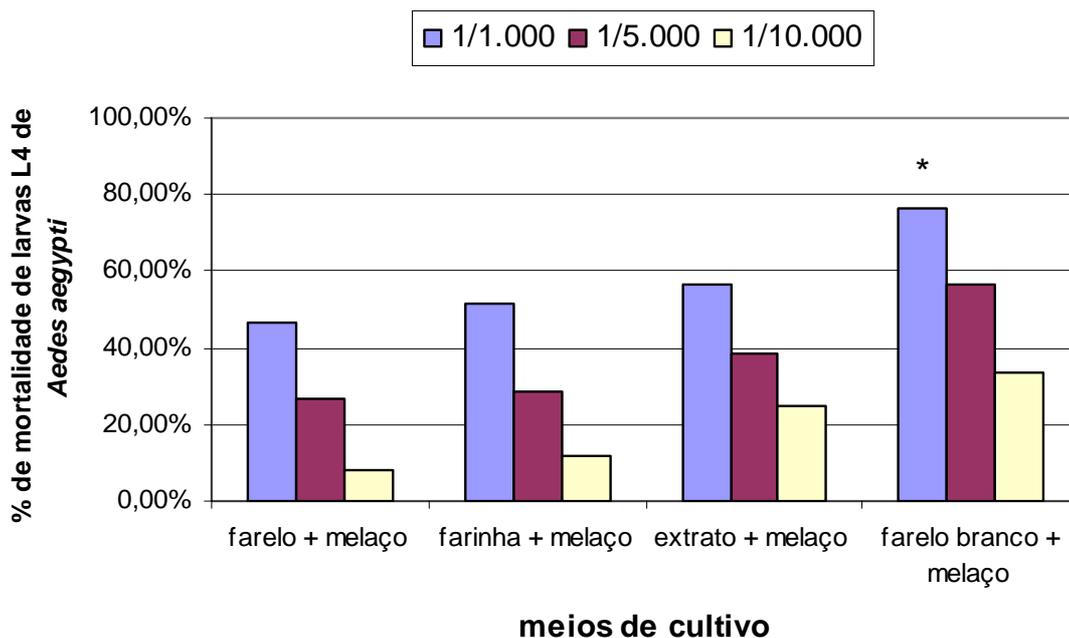
Após a padronização em pequena escala, parte-se para o escalonamento em biorreator de 2L. Os meios eram compostos com 1,5 litro e receberam uma taxa de inóculo de 10%, que se mostrou mais adequada para fermentações em grande escala. A agitação foi de 200rpm e uma taxa de aeração de 1v de ar por

volume de meio. Os produtos da fermentação foram aplicados contra larvas L4 de *Culex quinquefasciatus*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Escolha da fonte de nitrogênio

Conforme observa-se na Figura 2, os resultados mostraram que das quatro fontes de nitrogênio testadas - extrato de soja, farinha de soja, farelo de soja e farelo branco -, o farelo branco de soja propiciou uma maior taxa de mortalidade na fermentação com *Bacillus sphaericus* quando aplicado contra larvas L4 de *Aedes aegypti*. Esse resultado foi comprovado através da análise de variância (ANOVA), onde o meio com farelo branco de soja alcançou valores significativamente superiores as três demais fontes de nitrogênio.



* - Valor significativamente mais elevado com 95% de intervalo de confiança.

FIGURA 2: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Aedes aegypti* FRENTE AO BIOINSETICIDA PRODUZIDO COM QUATRO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

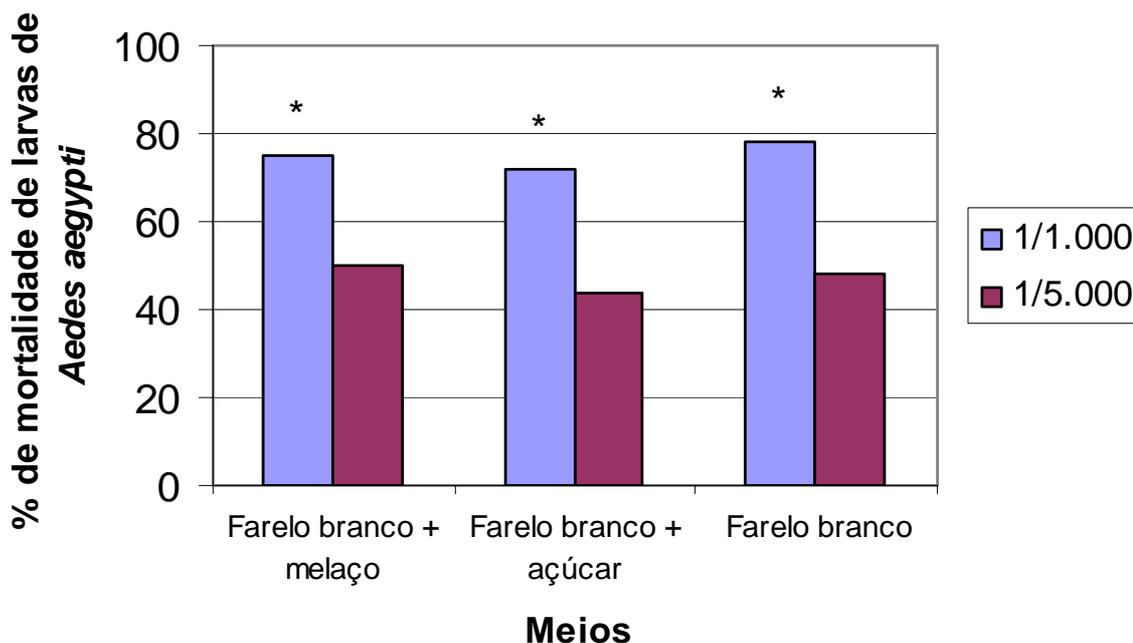
Analisando o resultado do teste, pôde-se observar dois diferentes platôs nos desempenhos de mortalidade. O primeiro deles, mais elevado, com o meio de

cultivo composto pelo farelo branco, o segundo com os meios compostos com farinha, farelo e extrato. Tal observação sugere uma diferença determinante na composição do farelo branco com os demais derivados da soja, que possibilitou um melhor desempenho no crescimento do *Bacillus sphaericus*.

Esse resultado pode ser explicado pela característica intrínseca do produto. Diferentemente dos demais produtos do beneficiamento da soja, o farelo branco apresenta um acréscimo de proteína em sua composição, alcançando valores superiores a 50%. Em contrapartida, compostos como lipídeos e carboidratos são quase inteiramente extraídos durante esse processo. A associação dessas características demonstrou ter um efeito positivo no crescimento de *Bacillus sphaericus* utilizando o farelo branco como fonte de nitrogênio.

4.2. Escolha da fonte de carbono

Os ensaios demonstraram que os três meios de cultivo tiveram praticamente os mesmos desempenhos, sem quaisquer diferenças significativas (Figura 3). Esse dado indica que compostos energéticos ricos em carboidratos pouco interferem na produção de *Bacillus sphaericus*, isto é, são inteiramente dispensáveis num meio de cultivo.



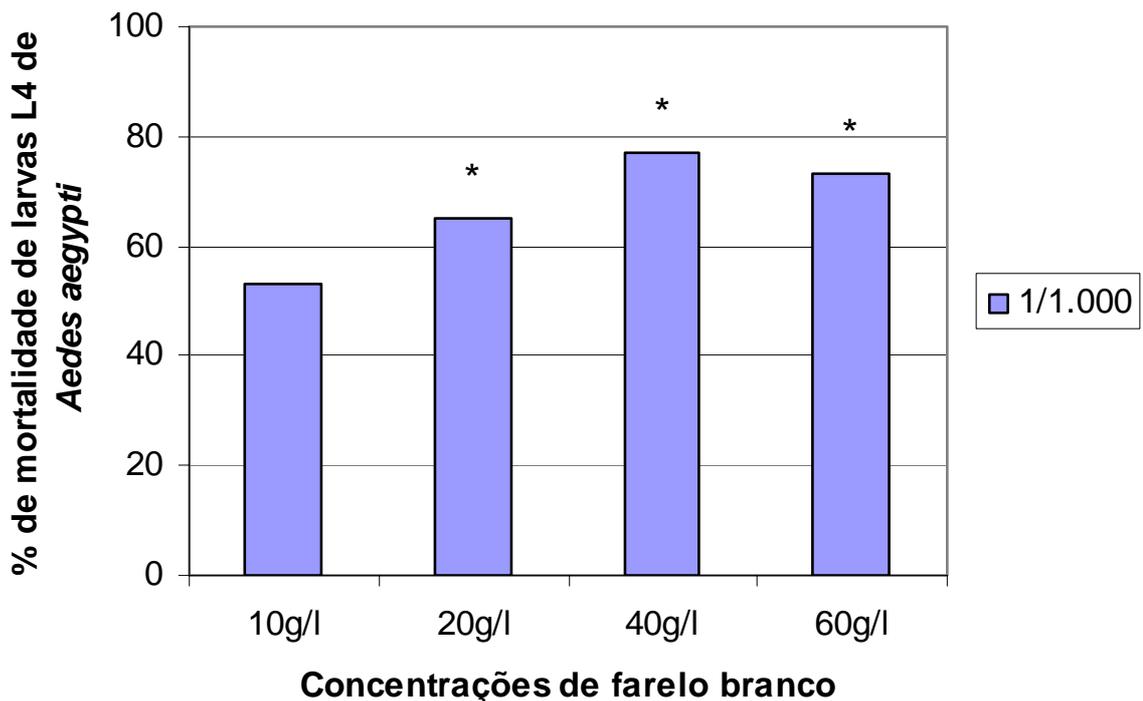
* - Valores significativamente iguais com 95% de intervalo de confiança.

FIGURA 3: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Aedes aegypti* FRENTE AO BIOINSETICIDA PRODUZIDO COM DUAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

Semelhante resultado foi observado e amplamente estudado por ALICE *et al.*, 2003. Neste trabalho, os autores relataram que *Bacillus sphaericus* não era capaz de utilizar açúcar como fonte de carbono por não dispor de enzimas que metabolizam tais compostos. Seus genes *ptsH* responsáveis por ativar o ciclo Fosfoenolpiruvato-Fosfotransferase se encontram mutados e perdem essa característica. Somente após a inserção de clones, extraídos de *Staphylococcus aureus*, esta via é restaurada e então as cepas de *Bacillus sphaericus* foram capazes de utilizar açúcares e carboidratos como fonte de carbono.

4.3. Determinação da melhor concentração de farelo branco de soja

Com o resultado do segundo bioensaio, optou-se por compor o meio de cultivo apenas com farelo branco de soja. Foram testadas as seguintes concentrações de farelo branco: 10g/l, 20g/l, 40g/l e 60g/l. Após a fermentação, os meios foram confrontados contra larvas de *Aedes aegypti* (Figura 4).



* - Valores significativamente iguais com 95% de intervalo de confiança.

FIGURA 4: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Aedes aegypti* FRENTE AO BIOINSETICIDA PRODUZIDO COM QUATRO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FARELO BRANCO DE SOJA.

Como pode ser observado na Figura 4, ao término do bioensaio pôde-se constatar que a concentração de 40g/l apresentou o melhor rendimento no que se refere à mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*. Por outro lado, quando submetido à Análise de Variância, esse melhor desempenho não se comprovou significativo. Sendo assim, as diluições de 20g/l, 40g/l e 60g/l obtiveram resultados estatisticamente iguais (95% de intervalo de confiança). Nessas condições, optou-se por utilizar a concentração de 20g/l em fermentações de pequena escala por uma questão de economia. Em grande escala, porém, o teste mereceria ser repetido para saber se a diferença das concentrações 20g/l e 40g/l permaneceriam abaixo dos valores significativos.

4.4. Determinação do tempo de fermentação

Períodos distintos de fermentação forneceram percentagens de mortalidade diferentes, como bem observado na figura 5. Ao término do

experimento, constatou-se que o tempo de 72h é o período de fermentação que possibilita maior produção de células e conseqüente maior produção de endotoxina.

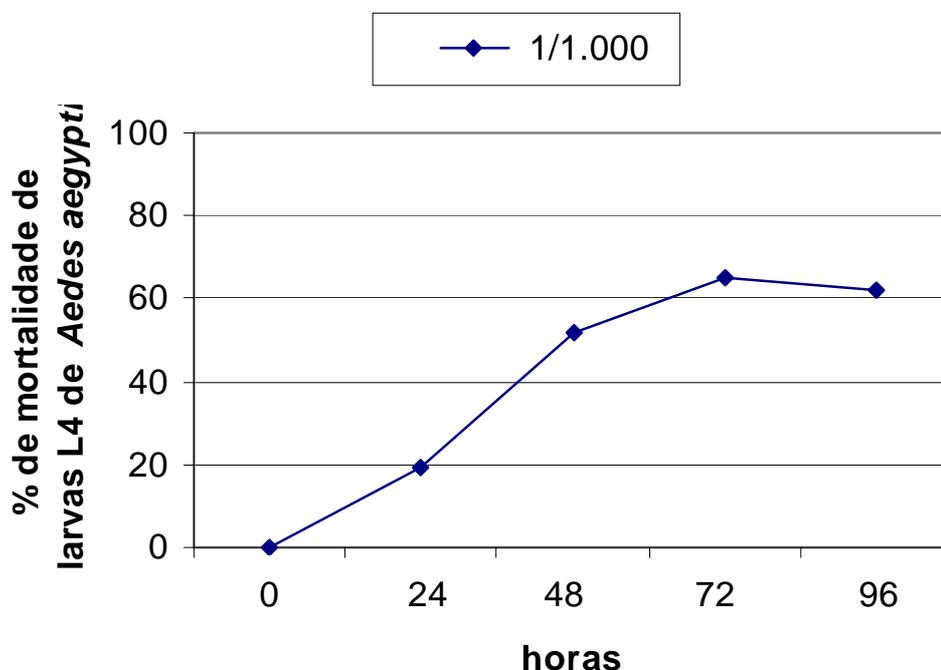
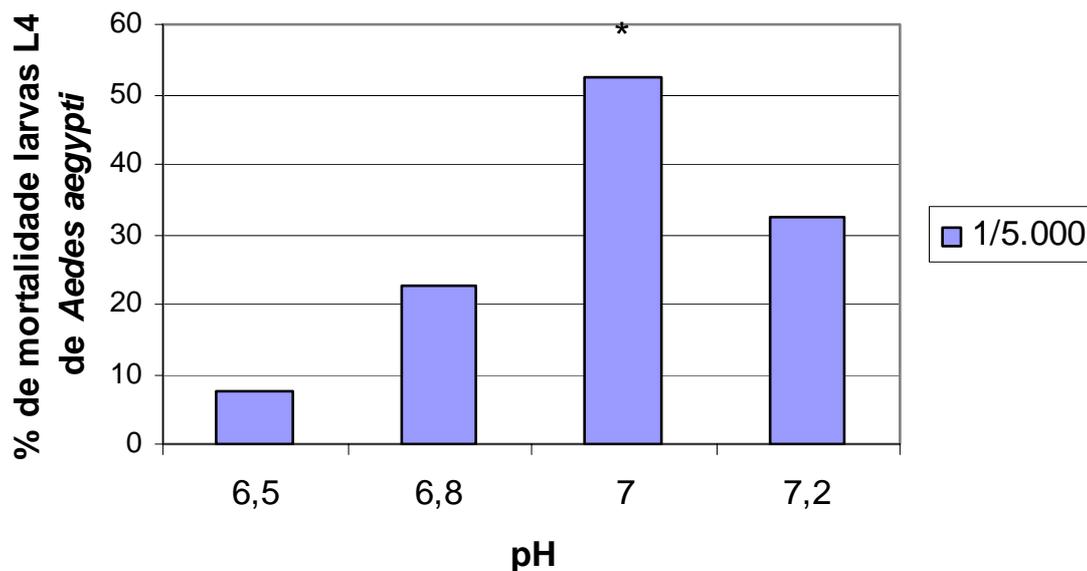


FIGURA 5: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Aedes aegypti* FRENTE AO BIOINSETICIDA COM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO.

O tempo de 72h também foi encontrado por POOPATHI *et al.* (2001), que padronizou como sendo o tempo para cultivo de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis israelensis* com o seu meio de cultivo a base de batata.

4.5. Determinação do pH inicial

Conforme observa-se na Figura 6, o pH de 7,0 propiciou um melhor desempenho na porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* e, sendo assim, foi padronizado como sendo o pH inicial dos meios de cultivo.



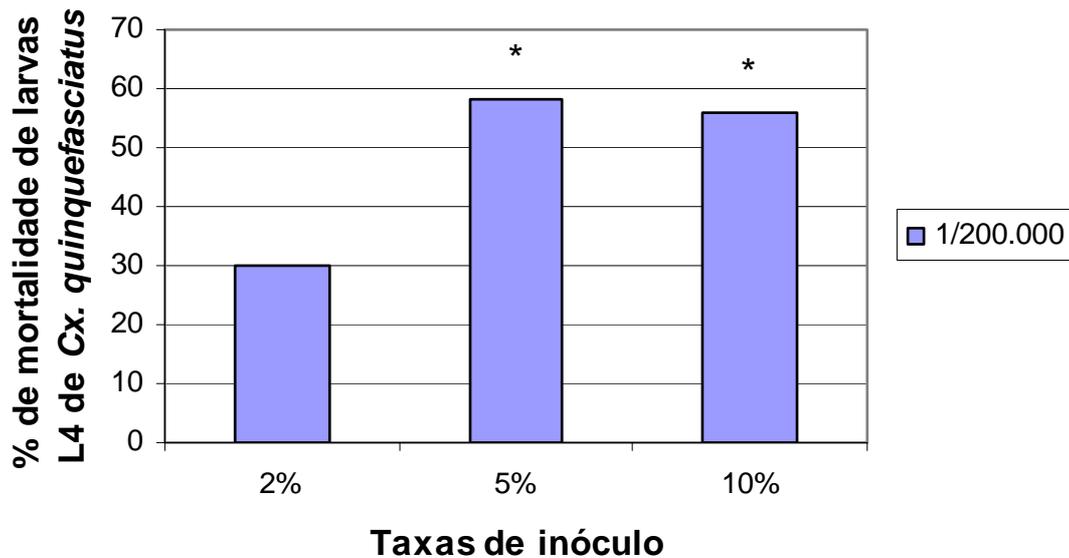
* - Valor significativamente mais elevado com 95% de intervalo de confiança.

FIGURA 6: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Aedes aegypti* FRENTE AO BIOINSETICIDA FERMENTADO EM QUATRO DIFERENTES pHs.

Tal valor não coincide com o pH usado no meio referência mais comumente usado. No meio Luria Bertani, o pH inicial tem o valor de 7,2. Apesar da diferença, é importante ressaltar que ambos meios de cultivo apresentam composições distintas, o que impossibilita uma comparação direta.

4.6. Quantificação da taxa de inóculo

Os resultados mostraram que a taxa de inóculo de 5% é suficiente para alcançar-se uma maior percentagem de mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* em pequena escala (Figura 7). O desempenho de mortalidade foi bem superior à taxa de inóculo de 2% e não apresentou diferenças significativas ao meio fermentando numa taxa de inóculo de 10%. Em grande escala, porém, taxas de inóculo de 5 e 10% devem ser testadas novamente.



* - Valores significativamente iguais com 95% de intervalo de confiança.

FIGURA 7: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Culex quinquefasciatus* FRENTE AO BIOINSETICIDA FERMENTADO EM TRÊS DIFERENTES TAXAS DE INÓCULO.

4.7. Suscetibilidade de larvas

Na Figura 8 consta a mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* tratados com o bioinseticida de *Bacillus sphaericus*. Esses resultados atestam que *Bacillus sphaericus* apresenta uma alta especificidade para larvas de *Culex quinquefasciatus*, comprovando seu melhor aproveitamento quando aplicado contra esse culicídeo. Para o controle de larvas de *Aedes aegypti*, o bioinseticida não se mostrou tão eficiente, atingindo baixos valores de mortalidade mesmo em pequenas diluições do produto. Esse resultado corrobora com as afirmações de SINGER (1974), BHUMIRATANA (1991), CONSOLI & OLIVEIRA (1994). Contra o *Culex quinquefasciatus*, o bioinseticida apresentou 100% de mortalidade numa diluição de até 1/100.000. Já o *Aedes aegypti* não se mostrou tão vulnerável ao produto, sem alcançar sequer 80% de mortalidade numa diluição de 1/1.000.

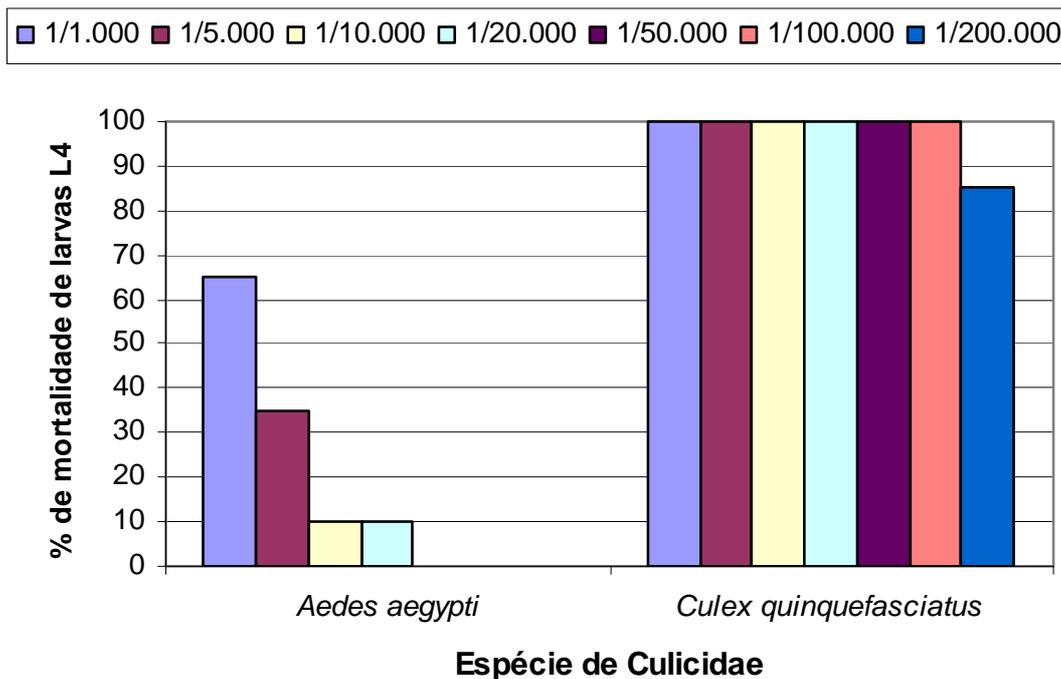


FIGURA 8: MORTALIDADE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus* FRENTE AO BIOINSETICIDA DE *Bacillus sphaericus*.

Uma especificidade tão elevada às larvas de *Culex quinquefasciatus* não são frequentemente relatadas. POOPATHI *et al.* (2001), utilizando um meio de batata, também encontraram uma maior eficiência do bioinseticida de Bs contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, porém a diferença de susceptibilidade entre as duas espécies não apresentou valores tão discrepantes. Isso pode significar que a composição do meio de cultivo com farelo branco de soja esteja produzindo uma resposta celular diferenciada, favorecendo uma maior eficiência do bioinseticida contra larvas de *Culex quinquefasciatus* e baixa mortalidade de *Aedes aegypti*. A diferença pode estar na produção das toxinas entomopatogênicas, o cristal binário (mais eficiente contra *Culex quinquefasciatus*) e a toxina Mtx (alta toxicidade contra diferentes espécies de culicídeos).

4.8. “Scale-up”

Para o escalonamento em biorreator de 2L, a taxa de inóculo de 10% mostrou-se a mais adequada. Empregaram-se duas configurações para o

meio de cultivo de farelo branco para determinar qual apresentaria os melhores resultados. A primeira recebeu uma concentração de 40g/l de farelo branco de soja, concentração que apresentou um maior resultado de mortalidade de larvas, a segunda com 20g/l, concentração que apresentou um resultado de mortalidade de larvas estatisticamente igual à concentração de 40g/l.

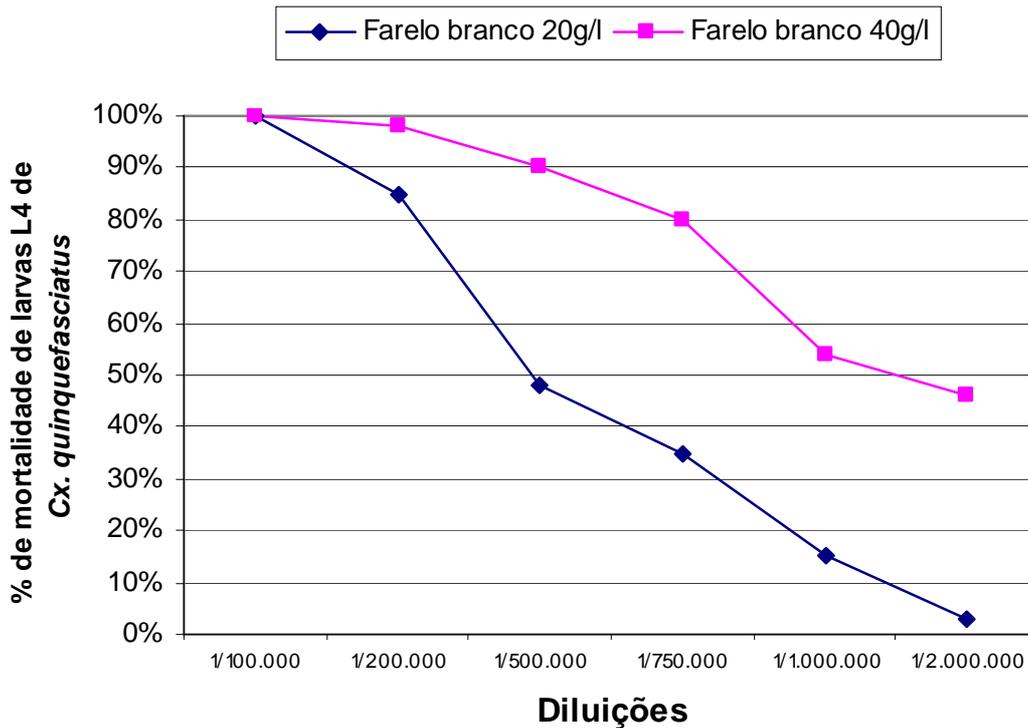


FIGURA 9: MORTALIDADE DE LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* FRENTE AO BIOINSETICIDA DE *Bacillus sphaericus* FERMENTADO EM BIORREATOR DE 2L.

Ao término do bioensaio, pôde-se constatar que a concentração de 40g/l de farelo branco de soja propiciou um maior crescimento de *Bacillus sphaericus* e conseqüente maior mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Diferentemente do ocorrido em pequena escala, a concentração que 40g/l alcançou uma taxa de mortalidade significativamente maior que a concentração de 20g/l. Esses resultados aparentemente conflitantes podem facilmente ser explicados quando analisa-se as diferenças dos processos fermentativos

empregados. Quando trabalha-se em pequena escala, a concentração de 20g/l se mostrou suficiente para se atingir o limite de mortalidade em pequena escala, 100% de mortalidade de *Culex quinquefasciatus* numa diluição de 1/100.000. Concentrações mais elevadas não propiciaram valores significativamente maiores devido à baixa atividade microbiana presente. Quando fermenta-se em biorreator, a alta concentração de oxigênio disponível possibilita um metabolismo microbiano mais exacerbado resultando num maior aproveitamento do meio de cultivo.

Quando comparado à fermentação em pequena escala, a fermentação em biorreator de 2L representou um ganho de produção do bioinseticida e uma maximização dos resultados de mortalidade de larvas, dependendo da concentração aplicada. Com o scale-up, foi possível trabalhar com diluições bastante elevadas e ainda obter-se resultados de mortalidade significativamente altos, como, por exemplo, atingir uma mortalidade de 90% numa diluição de 1/500.000 e uma mortalidade superior a 50% numa diluição de até 1/1.000.000.

5. CONCLUSÕES

Do trabalho pode-se concluir que:

- Em pequena escala, o meio de cultivo de *Bacillus sphaericus* é composto de farelo branco de soja 20g/l, fermentando por 72h a uma temperatura de 30°C, pH inicial do meio de 7,0, agitação de 120rpm e taxa de inóculo de 5%. Nessas condições apresenta uma taxa de mortalidade de 100% de *Culex quinquefasciatus* numa diluição de 1/100.000.
- Em biorreator de 2 litros, o meio de cultivo de *Bacillus sphaericus* é composto de farelo branco de soja 40g/l, fermentando por 72h a uma temperatura de 30°C, pH inicial do meio de 7,0, agitação de 200rpm, aeração de 1v de ar por volume de meio, taxa de inóculo de 10%. Nessas condições apresenta uma taxa de mortalidade de 100% de *Culex quinquefasciatus* numa diluição de 1/200.000.

6 – REFERÊNCIAS

ALICE, A. F.; PEREZ - MARTINEZ, G.; SANCHEZ - RIVAS, C. Phosphoenol-pyruvate phosphotransferase system and N-acetylglucosamine metabolism in *Bacillus sphaericus*. **Microbiology** v. 149 no. pt7 p. 1687-98, 2003.

BHUMIRATANA, A. Local production of *Bacillus sphaericus*. In: SUTHERLAND, A. & BARJAC, H (Eds) **Bacterial Control of Mosquitos and Black Flies**. USA: Rutgers University, 1991.

BLITVICH, R.; FERNANDEZ-SALAS, B.J., CONTRERAS, I. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. **Emerging Infectious Diseases** 1080-6040, v9 i7, p853 n.4, 2003.

BROWN, M. D.; WATSON, T. M.; CARTER, J.; PURDIE, D. M.; KAY, B. H. Toxicity of VectoLex (*Bacillus sphaericus*) products to selected Australian mosquito and nontarget species. **Journal of Economic Entomology**. v.97 n.1: 51-58, 2004.

CONSOLI, R.A.G.B. ; OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Interesse Médico**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

DAVIDSON , E. W. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae relationship to host range. **Journal of Medical Entomology** v.25, 151-157, 1988.

FILLINGER, U.; KNOLS, B.G.; BECKER, N. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**. v.8 n.1: 37-47, 2003.

FIOCRUZ, Agência Fiocruz de Notícias. Em busca do vírus do Oeste do Nilo. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/especiais/emergentes/nilo_wag.htm (acessado em 22 de jan 2006).

FODA, M. S.; EL-BENDARY, M. A.; MOHARAM, M. E. Salient parameters involved in mosquitocidal toxins production from *Bacillus sphaericus* by semi-solid substrate fermentation. **Egyptian Journal of Microbiology**. v. 38 n.3: 229-246, 2003.

GANUSHKINA, L.A.; LEBEDEVA, N.N.; AZIZBEKYAN, R.R.; SERGIYEV, V.P. The duration of the larvicidal effects of sporocrystalline mass of the bacteria *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the laboratory setting. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. n. 4, p. 25-29, 2000.

HAYES, S.M. 20th century insect control. **Agricultural Research Washington**. v. 40 n.7, p.4-9, 1992.

KIENK, K.; SNOW, J.; MORGAN, K. Alligators as West Nile Virus Amplifiers. **Emerging Infectious Diseases** v.10 no.12 p.2150-5, 2004.

LABIB, I. M.; DAWOUD, H. A. Cytopathological action in mosquito larvae fed with *Bacillus sphaericus* (strain faiyoum) spore/crystal complex. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. v. 33(2): 517-530, 2003.

LABIB, I. M.; MOHAMAD, A. A. Laboratory evaluation of *Bacillus sphaericus* recycling in mosquito larvae. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. v.33 n.2: 425-436, 2003.

MULLA, M. S.; THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; KONGNGAMSUK, W.; CHOMPOOSRI, J.; SU, T. Mosquito larval control with *Bacillus sphaericus*: Reduction in adult populations in low-income communities in Nonthaburi Province, Thailand. **Journal of Vector Ecology**. v. 26 n.2: 221-231, 2001.

NIELSEN - LeROUX, C.; PASTEUR, N.; PRETRE, J.; CHARLES, J. F.; BEN-SHEIKH, H.; CHEVILLON, C. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): The complex situation of west Mediterranean countries. **Journal of Medical Entomology**. v.39 n.5: 729-735, 2002.

OBETA, J. A. N.; OKAFOR, N. Production of *Bacillus sphaericus* strain 1593 primary powder on media made from locally obtainable Nigerian agricultural products. **Canadian Journal of Microbiology**. v: 29: 704-709, 1983.

OLIVEIRA, C. M. F.; SILVA - FILHA, M. H.; NIELSEN - LEROUX, C.; PEI, G.; YUAN, Z.; REGIS, L. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. **Journal of Medical Entomology**. 41 n.1: 58-64, 2004.

OLIVEIRA, C.M.F.; COSTA-FILHO, F.; BELTRAN, J.F.N.; SILVA-FILHA, M. H.;

REGIS, L. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its

resistance to *Bacillus sphaericus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.19 n.2: 125-129, 2003.

PEI, G.; OLIVEIRA, C.M.F.; YUAN, Z.; NIELSEN-LEROUX, C.; SILVA-FILHA, M.H.; YAN, J.; REGIS, L. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68 n.6: 3003-3009, 2002.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 986p, 1977.

POLLOM, T. E . V. **Desenvolvimento de Bioprocessos para produção de biomassa e Δ -endoxina de *Bacillus thuringiensis* (subs. *Israelensis*) Berliner, 1915 cepa BR01 Relacionado com o controle biológico de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Díptera: Culicidae):** Curitiba, 2003. Tese (Doutorado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

POOPATHI, S.; ARUNACHALAM, N.; GOPALAN, N.; BASKARAN, G.; MANI, T.R. Resistance to Malathion in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from Madurai, South India. **Insect Science and its Application**. v.21 n.3: p.251-255, 2001.

POOPATHI, S.; TYAGI, B. K. Studies on *Bacillus sphaericus* toxicity - related resistance development and biology in the filariasis vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from South India. **Applied Entomology and Zoology**. v. 37 n.3: 365-371, 2002.

POOPATHI, S.; KUMAR, K.A.; ARUNACHALAM, N.; TYAGI, B.K.; SEKAR, V. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) by *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, produced on a new potato extract culture medium. **Biocontrol Science and Technology**. v.13 n.8, 2003.

PROMDONKOY, B.; PROMDONKOY, P.; TANAPONGPIPAT, S.; LUXANANIL, P.; CHEWAWIWAT, N; AUDTHO, M.; PANYIM, S. Cloning and characterization of a mosquito larvicidal toxin produced during vegetative stage of *Bacillus sphaericus* 2297: **Current Microbiology**. 49 n.2: 84-88, 2004.

RABINOVITCH, L.; CAVADOS C. F. C.; LIMA, M. M. Dos *Bacillus*

entomopatogênicos, o que se espera? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.6, p.40-41, 1998.

ROCHA, E. M.M.; FONTES, G. Filariose bancroftiana no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.32, no.1, p.98-105, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. - **Molecular cloning - A laboratory Manual**. 2nd ed New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHWARTZ, J. L. ; POTVIN, L.; COUX, F.; CHARLES, J. F.; BERRY, C.; HUMPHREYS, M. J.; JONES, A. F.; BERNHART, I.; DALLA - SERRA, M.; MENESTRINA, G. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. **Journal of Membrane Biology**. v.184 n.2: 171-183, 2001.

SELEENA, P.; LEE, H.L.; CHOOI, K.H.; JUNAIDIH, S.: Space spraying of bacterial and chemical insecticides against *Anopheles balabacensis* *baisais* for the control of malaria in Sabah, East Malaysia. Southeast Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 35 n.1: 68-78, 2004.

SHI, Y.X.; ZHENG, D. S.; YUAN, Z. M. Toxicity of *Bacillus sphaericus* LP1-G against susceptible and resistant *Culex quinquefasciatus* and the cloning of the mosquitocidal toxin gene. **Current-Microbiology**. v. 47 n.3: 226-230, 2003.

SILVA-FILHA, M.H.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; FURTADO, A.F. Impact of a 26 month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**.v.17 n.1: 45-50, 2001.

SILVA-FILHA, M.H.N.L; OLIVEIRA, C.M.F.; REGIS, L; YUAN, Z.M.; RICO,C. M.; NIELSEN-LEROUX, C. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. **FEMS Microbiology Letters**. v. 241 n.2: 185-191, 2004.

SINGER, S. Entomogeneous bacilli against mosquito larvae. **Development Industrial Microbiology** v. 15: 187-194, 1974.

SKOVMAND, O; SANOGO, E. Experimental formulations of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. **Journal of Medical Entomology**.; v. 36 n.1: 62-67, 1999.

SPIELMAN, A.; ANDREADIS, T. G.; APPERSON, C. S. Outbreak of West Nile Virus in North America. **Science** v. 306 p. 1473-5, 2004.

WHO. Report of Informal consultation of the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BVC/*Sphaericus*/85.3 S.l., 23pp., 1985.

WHO. The Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis . Disponível em www.filariasis.org/index.pl (acessado em 22 de jan. 2006).

YAP, H. H. Biological control of mosquitoes, especially malaria vectors Anopheles species Southeast Asian. **Tropical Medicine Public Health**. v.16 n.1: 163-172, 1985.

YOUSTEN, A. A., WALLIS, D. A.; SINGER, S. Effect of oxygen on growth, sporulation and mosquito larval toxic formation by *Bacillus sphaericus*. **Development Industrial Microbiology**. v. 25, 757-762, 1984.

YUAN, Z.M.; PEI, G. F.; REGIS, L.; NIELSEN - LEROUX, C.; CAI, Q.X. Cross - resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus* . **Medical and Veterinary Entomology**. v.17 n.3: 251-256, 2003.

ZAHIRI, N.S.; SU, T.; MULLA, M.S. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. **Journal of Medical Entomology**. v.39 n.3: p.513-520, 2002.

ZAHIRI, N. S.; MULLA, M. S. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Journal of Medical Entomology** v..40 n.5: p. 672-677, 2003.

ZAHIRI, N. S.; FEDERIC, B. A.; MULLA, M. S. Laboratory and simulated field evaluation of a new recombinant of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquito larvae (Diptera: culicidae). **Journal of Medical Entomology**. v.41 n. 3: p. 423-429, 2004.

CAPÍTULO 2:

**Controle biológico de *Culex (Culex) quinquefasciatus* exercido
pelo *Bacillus sphaericus* cultivado no meio de farelo branco de
soja**

RESUMO

A eficiência do bioinseticida de *Bacillus sphaericus* produzido a partir do meio de cultivo de farelo branco de soja 40g/l foi comparado ao meio referência Luria Bertani, composto de peptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l e cloreto de sódio 5g/l. Os testes foram realizados com larvas L4 de *Culex quinquefasciatus* e tiveram suas respectivas mortalidades aferidas. Os meios de cultivo fermentaram em biorreator de 2L por 72h, temperatura de 30°C, a velocidade de 200rpm e taxa de inóculo de 10%. Observou-se uma maior eficiência na mortalidade de larvas propiciado pelo meio de cultivo produzido com farelo branco de soja, que alcançou uma eficácia de 100% numa diluição de 1/100.000, 98% numa diluição de 1/250.000, 90% numa diluição de 1/500.000, 54% numa diluição de 1/1.000.000 e 46% numa diluição de 1/2.000.000. O meio Luria Bertani propiciou uma mortalidade de 100% numa diluição de 1/100.000, 88% numa diluição de 1/250.000, 42% numa diluição de 1/500.000, 2% numa diluição de 1/1.000.000 e não apresentou resultado numa diluição de 1/2.000.000. A comparação do gasto necessário para a formulação dos meios de cultivo também favoreceu o meio com farelo branco de soja, que mostrou-se mais econômico que o meio referência Luria Bertani numa relação próxima de 1:140.

Palavras-chaves: *Bacillus sphaericus*, farelo branco de soja, Luria Bertani, *Culex quinquefasciatus*,

ABSTRACT

The efficiency of *Bacillus sphaericus* as a bioinsecticide using soy protein concentrated as a culture medium (40g/l) was compared to the reference medium Luria Bertani. This medium is composed by peptone 10g/l, yeast 5g/l and sodium chloride 5g/l. Tests were made observing mortality of *Culex quinquefasciatus* L4 larvae. Culture media were fermented in 2L bioreactor system during 72h at 30°C, rotation of 200rpm and inoculum rate of 10%. The bioassay showed 100% mortality of *Culex quinquefasciatus* larvae using soy protein concentrated at 1/100,000 dilution of the bioinsecticide, 98% mortality at 1/250,000, 90% at 1/500,000, 54% at 1/1,000,000 and 46% at 1/2,000,000 dilution. As for Luria Bertani medium, mortality of this mosquito was 100% at 1/100,000, 88% of mortality was observed at 1/250,000 dilution, 42% at 1/500,000, 2% at 1/1,000,000 and none of the larvae have died at 1/2,000,000 dilution. Concerning to costs spent on media preparation, the one using soy protein concentrated was far low-cost compared to Luria Bertani medium in a rate near to 1:140.

Keywords: *Bacillus sphaericus*, soy protein concentrated, Luria Bertani, *Culex quinquefasciatus*.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de bactérias produtoras de endotoxina como *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* e *Bacillus sphaericus* abriu um novo campo de possibilidades aos programas de controle e erradicação de dípteros vetores. Comparados aos inseticidas sintéticos usados há muitas décadas, esses *bacilli* apresentam a vantagem de ser ambientalmente seguros, não cumulativos na cadeia trófica e inócuos a organismos não-alvo. Sendo assim, nos últimos anos pôde-se constatar um crescente aumento no interesse à utilização dos bioinseticidas por parte das autoridades sanitárias.

O *Bacillus sphaericus* (Bs) é uma bactéria aeróbica gram-positiva produtora de uma toxina binária com um alto poder larvicida a algumas espécies de Culicidae. Sua aplicabilidade geralmente é destinada aos programas de controle de *Culex quinquefasciatus*, tendo um papel importante na prevenção da filariose linfática (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Além disso, bioinseticidas de Bs também podem ser utilizados contra larvas de espécies do gênero *Anopheles*, podendo ser empregados nos programas de controle de malária (YAP, 1985).

Embora o potencial dos inseticidas biológicos seja seguramente incontestável, existem alguns entraves à utilização. Normalmente os processos fermentativos que originam esses produtos são por demais dispendiosos, aumentando significativamente o custo final dos bioinseticidas. Esse custo adicional muitas vezes desestimula o seu uso, principalmente quando comparados com os inseticidas químicos baratos de última geração, como os piretróides.

O *Bacillus sphaericus* é considerado uma bactéria não exigente, sem necessitar de meios de cultivo diferenciados ou seletivos. Da mesma forma, também não depende de condições especiais para se desenvolver. Estudos já revelaram que um sistema de aeração convencional é suficiente para garantir uma boa taxa de crescimento, esporulação e formação da toxina larvicida de forma satisfatória (BHUMIRATANA, 1991). Todavia, apesar do cultivo de *Bacillus*

sphaericus seguir uma técnica simples e comum aos microrganismos, além de não exigir uma formulação complexa e enriquecida, o meio de cultivo usualmente utilizado na produção de *Bacillus sphaericus* contribuiu para uma elevação do custo final do produto. O meio referência Luria Bertani (SAMBROOK *et al.*, 1989) compõe-se de Peptona, Extrato de Levedura e Cloreto de Sódio, numa proporção 10:5:10, compostos que resultam num custo elevado demais para ser empregado como matéria-prima.

Segundo BHUMIRATANA (1991), estudos indicaram que o custo com matérias-primas não deve superar 2% do custo total de produção de cultivo de *Bacillus sphaericus*. Os custos operacionais (agitação, aeração, esterilização, esfriamento) compõem 36% e o custo laboratorial 62%. Para que a produção de um bioinseticida seja um investimento viável, os gastos com a matéria-prima devem ser reduzidos ao máximo, pois os custos operacionais e laboratoriais geralmente são invariáveis.

Na década de 80, a busca por matérias-primas de baixo custo se acentuou bastante, quando diversos pesquisadores elaboraram meios de cultivo a partir de produtos de origem animal e vegetal. OBETA & OKAFOR (1983) testaram o uso de sementes de feijão de corda, amendoim e soja adicionados a uma base composta de sangue bovino ressecado e sais minerais para produção de *Bacillus thuringiensis*. VANDEKAR & DULMAGE (1982) usaram amendoim, semente de algodão, mandioca, batata doce juntamente com sangue bovino ressecado, ossos de carne, partes de frango, farinha de peixe entre outros para *Bacillus thuringiensis*. ARCAS *et al.* (1984) noticiaram o uso de extrato de broto de malte para Bti. HERTLEIN *et al.* (1981), visando reduzir os custos, chegaram a propor o cultivo de Bti e Bs usando proteína animal, esterco, água de dejetos e restos agrícolas.

Por outro lado, embora o uso de uma infinidade de subprodutos agrícolas e dejetos animais tivesse o intuito de reduzir o gasto em matérias-primas, essa estratégia acabou não surtindo o efeito esperado. Apesar do custo dessas fontes ser ínfimo, o investimento economizado era transferido aos extensivos pré-tratamentos necessários para possibilitar o uso de tais fontes, como purificação,

extração e hidrólise. No final, o custo dessas matérias-primas não se mostrou viável.

Atualmente, algumas formulações vêm sendo empregadas com sucesso no cultivo de *Bacillus sphaericus*, a maioria delas, porém, nas mãos de fontes de interesses econômicos que não revelam sua formulação (BHUMIRATANA, 1991). Paralelamente a isso, embora bioinseticidas formados a partir de *Bacillus sphaericus* sejam a cada dia amplamente estudados e utilizados, trabalhos que envolvam sua produção a partir de materiais-primas simples são extremamente escassos. Geralmente opta-se por empregar as formulações comerciais, como Vectolex® ou Spherix®.

Recentemente, POOPATHI *et al.* (2003) empregaram com sucesso um meio de cultivo composto de batata enriquecido com açúcares na produção de Bti e Bs. FODA *et al.*, (2003) testaram diversas matérias-primas e alcançaram maiores níveis de toxicidade a larvas de insetos utilizando farinha de semente de algodão e farinha de gergelim, demonstrando o grande potencial existente nos grãos.

O presente trabalho tem como objetivo comparar o meio de cultivo de *Bacillus sphaericus* composto com farelo branco de soja com o meio da literatura Luria Bertani fermentados em biorreator de 2L avaliando:

1. Resultados de mortalidade frente larvas L4 de *Culex quinquefasciatus*.
2. O preço final das matérias-primas necessárias para a produção do bioinseticida.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Processo de obtenção do farelo branco de soja

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa de ciclo anual, nativa do sudeste da Ásia que atualmente é considerado um dos grãos mais importantes no cenário mundial. Em média, a soja possui 40% de proteínas, 34% de carboidratos, 20% de lipídios (óleo) e 5% de minerais (EMBRAPA, 2006). Sua utilização abrange

uma infinidade de produtos, desde a indústria alimentícia (óleo e leite de soja), farmacêutica (isoflavona e lecitina) e até a produção de combustíveis (biodiesel).

No Brasil, o destino principal da soja é a extração do óleo de soja. O processo começa descascando-se a semente e em seguida moendo. Posteriormente, a soja é embebida a uma solução de n-hexano e armazenada no interior de um silo, onde os lipídios são extraídos da soja para o solvente. Como resultado desse processo, obtém-se o farelo de soja desengordurado e a mistura solvente-óleo. O óleo é separado do solvente por destilação, sofrendo outros processos antes de estar pronto para o consumo. O farelo desengordurado passa por um processo de desolvatização, secagem, tostagem e resfriamento (SOLAE, 2006).

Para se adicionar uma quantidade ainda maior de proteínas ao farelo, outra metodologia é empregada. Nesse processo, os açúcares são extraídos usando uma solução de etanol 60% como solvente. Na reação, os açúcares são solubilizados e retirados, impregnando a solução de etanol, e assim as proteínas são mantidas no farelo. Através de um processo de destilação, o etanol é separado voltando para o extrator e os açúcares são concentrados em forma de melaço de soja. O farelo oriundo desse processo, agora livre do óleo, lipídeos e carboidratos totais, alcança uma concentração protéica de até 65%. Nessas condições passa a ser chamado de Farelo Branco de Soja, Proteína Concentrada de Soja ou SPC, “Soy Protein Concentred” (SOLAE, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMO

O microrganismo usado no presente trabalho é o *Bacillus sphaericus* (cepa 2362) procedente do Instituto Pasteur de Paris. O material foi conservado em pequenas alíquotas descritas no capítulo 1, item 3.2.1. e fermentou em biorreator de 2 L como relatada no capítulo 1, item 3.9.

3.2. MEIOS DE CULTIVO

Foram utilizados neste trabalho dois meios de cultivo que tiveram os desempenhos em bioensaios comparados. O primeiro meio de cultivo era o referência Luria Bertani (LB), composto de peptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l e cloreto do sódio 10g/l, pH 7,2. O segundo foi o meio de cultivo proposto no presente trabalho composto de farelo branco de soja numa concentração 40g/l, pH 7,0.

3.3. BIOENSAIOS

O desempenho dos meios de cultivo foram aferidos através da mortalidade de larvas em bioensaios contra *Culex quinquefasciatus*. O procedimento ocorria conforme descrito no capítulo 1, item 3.3.

4. RESULTADOS

Nos bioensaios utilizando o meio de cultivo de *Bacillus sphaericus* Luria Bertani e farelo branco de soja fermentados em biorreator de 2L, obteve-se um resultado variável de mortalidade conforme a diluição empregada (Tabela 1 e Figura 1).

TABELA 1: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Culex quinquefasciatus* PRODUZIDA PELO MEIO DE CULTIVO LURIA BERTANI E FARELO BRANCO DE SOJA

diluição	LB	Farelo branco
1/100.000	100%	100%
1/250.000	88%	98%
1/500.000	42%	90%
1/750.000	20%	80%
1/1.000.000	2%	54%
1/2.000.000	0	46%

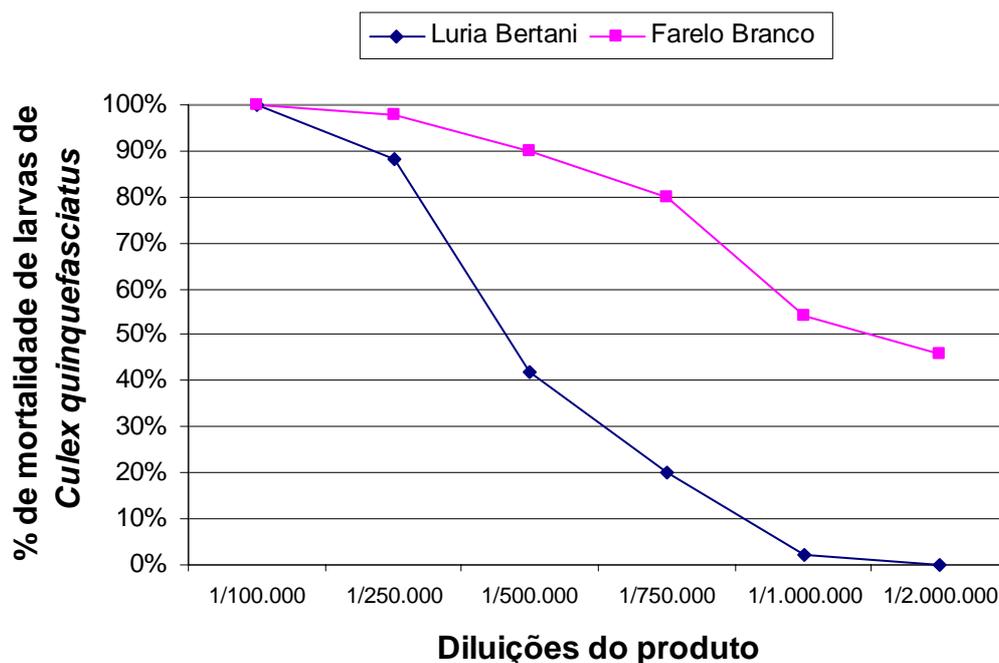


FIGURA 1: MORTALIDADE DE LARVAS L4 DE *Culex quinquefasciatus* PRODUZIDA PELO MEIO DE CULTIVO LURIA BERTANI E FARELO BRANCO DE SOJA

De acordo com o resultado, fica nítido o melhor desempenho obtido pelo farelo branco de soja quando comparado com o meio referência LB. O meio de cultivo com farelo branco de soja apresentou uma eficácia bastante elevada nas primeiras diluições do produto, mantendo 90% de mortalidade das larvas de *Culex quinquefasciatus* numa diluição de 1/500.000. A eficácia do produto se manteve estável enquanto aumentava-se a diluição, permanecendo superior a 50% de mortalidade mesmo quando aplicado em uma diluição de 1/1.000.000, o que equivaleria a 1 grama do produto diluído em 1.000 litros de água.

O meio referência LB não apresentou semelhante eficiência. A mortalidade das larvas de *Culex quinquefasciatus* permaneceu elevada apenas nas duas primeiras diluições do produto, 1/100.000 e 1/250.000. Logo em seguida, quando trabalhou-se com a diluição de 1/500.000, foi observado uma queda acentuada na toxicidade do bioinseticida, atingindo uma mortalidade inferior a 50%. A queda se manteve elevada até praticamente desaparecer na diluição 1/1.000.000.

Da mesma forma que os resultados de mortalidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* apresentaram valores amplamente favoráveis ao meio farelo branco de soja, a comparação do custo empregado na formulação dos meios permanece igualmente desigual, como visto na Tabela 2.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DOS CUSTOS NA ELABORAÇÃO DO MEIO REFERÊNCIA E O MEIO PROPOSTO.

Meio de cultivo	Composição	Quantidades (g/l)	Custo final (US\$/l)	Diferença no custo
Luria Bertani	Peptona + extrato de levadura + cloreto de sódio	10 + 5 + 10	2,24	1:280
Farelo branco de soja	Farelo branco de soja	40	0,016	

A diferença do custo empregado na formulação dos meios se mostrou tão discrepantes devido a origem das matérias-primas utilizadas. Enquanto o meio referência Luria Bertani é produzido a partir de substâncias laboratoriais de custo elevado vendidos em pequenas quantidades, o meio farelo branco de soja não emprega ingredientes de preços elevados. Tendo na sua composição apenas o próprio farelo branco de soja, o custo termina sendo quase desprezível, tendo em vista que esse derivado da soja é usado como ingrediente de ração animal, vendido apenas em grandes quantidades, por tonelada. Como resultado observa-se uma proporção acima de 1: 140 no custo para a produção de 1 litro do meio farelo branco de soja quando comparado ao necessário para a produção da mesma quantidade do meio referência Luria Bertani. Além disso, como o meio com farelo branco de soja apresentou uma mortalidade mais elevada, menores quantidades do bioinseticida eram necessárias. Sendo assim, para obter-se uma mortalidade de 90%, por exemplo, empregava-se apenas a metade da quantidade

do meio farelo branco de soja. Como resultado, a proporção do custo duplicaria, passando para 1:280.

5 – DISCUSSÃO

5.1. Considerações sobre o farelo branco de soja

O sucesso na utilização do farelo branco de soja como matéria-prima do meio de cultivo para *Bacillus sphaericus* pode ser explicado devido a sua composição química. Como já mencionado, esse produto do beneficiamento da soja possui a característica de apresentar uma alta concentração de proteínas. Como resultado, temos um farelo de soja cuja composição não se assemelha muito ao grão *in natura*, que é de uma semente que possui, além de proteínas, carboidratos e lipídios. Por esse motivo, outros trabalhos que empregaram a soja como componente do meio de cultivo não demonstraram resultados tão consistentes. KUPPUSAMY (1990) e KUMAR *et al.* (2000) chegaram a testar meios de cultivo com soja, mas observaram apenas resultados similares aos obtidos com o meio referência LB. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de estarem trabalhando com o grão *in natura*, que não propicia resultados de mortalidade de larvas tão elevados.

Da mesma forma, durante o processo de formação do farelo branco de soja, componentes como lipídeos e carboidratos totais são quase inteiramente extraídos nos procedimentos químicos aos quais os grãos de soja são submetidos. A ausência dessas substâncias não demonstrou decréscimos na produtividade de células bacterianas e endotoxinas. De acordo com ALICE *et al.*, (2003), a impossibilidade de metabolizar açúcares faz com que esse compostos sejam inteiramente dispensáveis no meio de cultivo. O óleo, um ingrediente tão presente no grão de soja, também demonstrou ser supérfluo, já que o microrganismo se desenvolveu com sucesso no farelo branco, derivado da soja que dispõe quantidades ínfimas de óleos e lipídeos. Por não utilizar carboidratos no seu metabolismo, imagina-se que o *Bacillus sphaericus* utilize outra rota

metabólica que possibilite crescer, multiplicar e produzir endotoxina. Essa estratégia parece ser muito favorecida pela composição do farelo branco de soja.

5.2. O meio farelo branco de soja e o meio batata

Em 2002, POOPATHI *et al.* relataram o desenvolvimento de um meio de cultivo de baixo custo para a produção de *Bacillus thuringiensis israelensis* e *Bacillus sphaericus*. Os autores propuseram três meios, dois deles compostos de batata e uma fonte diferente de açúcar e outro apenas com batata. Para tanto, os autores demonstraram bons resultados de mortalidade de três espécies de culicídeos utilizando as duas bactérias como biolarvicidas. Os meios foram comparados entre si e com o meio referência, mostrando uma eficiência muito próxima do Luria Bertani.

Por outro lado, embora o meio de batata proposto por POOPATHI *et al.* (2002) tenha se mostrado igualmente eficiente e muito mais econômico do que o meio Luria Bertani, uma comparação com o meio farelo branco de soja não se mostraria tão favorável. Por utilizar batata em sua composição, o meio proposto por aqueles autores necessita de uma grande quantidade do vegetal para obter recursos nutricionais suficientes para o microrganismo. A composição do meio batata necessita 150g/l de batata, que devem ser fervidos e processados antes de compor o meio. Tal quantidade resultaria um custo elevado se comparado com o meio farelo branco de soja, que utiliza apenas 40g/l do farelo previamente moído. A diferença na quantidade de matéria-prima necessária pode ser explicada pela composição distinta de cada ingrediente. A batata é um tubérculo rico, principalmente, em amido, sendo pobre em proteínas. Por isso pode-se entender porque foram necessários 150g de batata para alcançar as necessidades nutricionais do *Bacillus sphaericus*. O farelo branco de soja, ao contrário, apresenta uma composição nutricional muito mais rica em nitrogênio, sendo necessário apenas 40g/l para se garantir uma fermentação bastante produtiva.

5.3. Estabilidade do bioinseticida

O bioinseticida de *Bacillus sphaericus* produzido a partir do meio de cultivo com farelo branco de soja apresenta uma boa estabilidade. Conservado a -4°C, vem apresentando a mesma eficácia de mortalidade de larvas de culicídeos há um período superior a um ano, quando os primeiros bioinseticidas com essa formulação foram produzidos.

6. CONCLUSÕES

O meio de cultivo composto de farelo branco de soja 40g/l mostrou-se mais eficiente do que o meio referência Luria Bertani contra larvas L4 de *Culex quinquefasciatus*. Fermentando em biorreator de 2L, o meio farelo branco de soja obteve uma mortalidade de 90% numa diluição de 1/500.000 e acima de 50% numa diluição de 1/1.000.000. O meio referência obteve respectivamente 42% e 2% nessas mesmas diluições.

No que diz respeito ao custo empregado na elaboração de cada meio de cultivo, o meio farelo branco de soja demonstrou ser mais econômico do que o meio Luria Bertani numa proporção próxima a 1:280.

Apesar dos bons resultados obtidos em ensaios laboratoriais, trabalhos mostrando o desempenho do produto em campo se fazem necessários. Da mesma forma, a composição do bioinseticida pode ser otimizada a formulações de fácil aplicação e transporte.

7 – REFERÊNCIAS

ALICE, A. F. ; PEREZ - MARTINEZ, G. ; SANCHEZ - RIVAS, C. Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system and N-acetylglucosamine metabolism in *Bacillus sphaericus*. **Microbiology** v. 149 no. pt7 p. 1687-98, 2003.

ARCAS, J.; YANTORNO, O.; ERTOL, R. A new médium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Biotechnology Letters**. 6: 495-500, 1984.

BHUMIRATANA, A. Local production of *Bacillus sphaericus*. In: SUTHERLAND, A. & BARJAC, H (Eds) **Bacterial Control of Mosquitos and Black Flies**. USA: Rutgers University, 1991.

CONSOLI, R.A.G.B. ; OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Interesse Médico**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

EMBRAPA - Soja - Usos da soja Disponível em http://www.cnpsa.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29 (acessado em 12 de jan 2006).

FODA, M. S.; EL-BENDARY, M. A.; MOHARAM, M. E. Salient parameters involved in mosquitocidal toxins production from *Bacillus sphaericus* by semi-solid substrate fermentation. **Egyptian Journal of Microbiology**. v. 38 n.3: 229-246, 2003.

HERTLEIN, B. C. ; HORNBY, J.; LEVY, R.; MILLER, T.W.Jr. Prospects of spore forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. **Development Industrial Microbiology**. 22: 53-60, 1981.

KUMAR, A.; KUMAR, Sra.; SANGODKAR, U.M.X.; SHARMA, V.P. Advances in the bio-control of mosquito vectors utilizing *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Proceeding of National Academy of Science**, India LXX, 1-20, 2000.

KUPPUSAMY, M. **Studies based on the production , formulation and by-production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus* H-5A5B**. PhD. Thesis, Vector Control Research Centre, Pondicherry, India, 1990.

OBETA, J. A. N.; OKAFOR, N. Production of *Bacillus sphaericus* strain 1593 primary powder on media made from locally obtainable Nigerian agricultural products. **Canadian Journal of Microbiology**. v: 29: 704-709, 1983.

POOPATHI, S.; KUMAR, K. A.; ARUNACHALAM, N.; TYAGI, B.K.; SEKAR, V. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) by *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, produced on a new potato extract culture medium. **Biocontrol Science and Technology**. v.13 n.8, 2003.

POOPATHI, S.; KUMAR, K.A.; KABILAN, L.; SEKAR, V. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* . **World Journal of Microbiology & Biotechnology** v.18: 209-210, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F. & MANIATIS, T. - **Molecular cloning - A laboratory Manual**. 2nd ed New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SOLAE. Fundamentos da soja. Anatomia do grão. Disponível em <http://www.solae.com.br/soyessentials/soyessentials.html> (acessado em: 05 de fev. 2006).

VANDEKAR, M.; DULMAGE, H. T. Guidelines for the production of *Bacillus thuringiensis* H-14. **Proceedings of a consultation held in Geneva**, Switzerland. 25-28 1982. Geneva UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for the Research and Training in Tropical Disease.

YAP, H. H. Biological control of mosquitoes, especially malaria vectors *Anopheles* species Southeast Asian. **Tropical Medicine Public Health**. v.16 n.1: 163-172, 1985.