

# BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

COORDENADORES:

URGEL DE ALMEIDA LIMA  
EUGÊNIO AQUARONE  
WALTER BORZANI  
WILLIBALDO SCHMIDELL

VOLUME 3

PROCESSOS  
FERMENTATIVOS  
E ENZIMÁTICOS



EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA



Coordenadores:  
URGEL DE ALMEIDA LIMA  
EUGÊNIO AQUARONE  
WALTER BORZANI  
WILLIBALDO SCHMIDELL

**BIOTECNOLOGIA  
INDUSTRIAL  
VOLUME III  
PROCESSOS  
FERMENTATIVOS  
E ENZIMÁTICOS**



EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA.

© 2001 *Urgel de Almeida Lima*  
*Eugênio Aquarone*  
*Walter Borzani*  
*Willibaldo Schmidell*

*1ª edição - 2001*

*É proibida a reprodução total ou parcial  
por quaisquer meios  
sem autorização escrita da editora*

EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA.  
*Rua Pedroso Alvarenga, 1245 - cj. 22*  
*04531-012 – São Paulo, SP – Brasil*  
*Fax: (0xx11)3079-2707*  
*e-mail: eblucher@uol.com.br*

*Impresso no Brasil Printed in Brazil*



EDITORA AFILIADA

---



---

# AUTORES

---



---

**André Luiz Ferraz***Professor Doutor*

Faculdade de Engenharia Química de  
Lorena  
Centro de Biotecnologia  
Caixa Postal 116  
12600-000, Lorena, SP, Brasil

**Celso Lellis Bueno Netto***Doutor em Engenharia (Universidade de  
Toulouse)*

Consultor autônomo  
Celsobn@uol.com.br

**Deise Maria Fontana Capalbo***Pesquisadora*

Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária  
Rodovia SP 340, km 127,5  
Caixa Postal 69  
13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

**Elisabeth F. Pires Augusto***Pesquisadora*

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do  
Estado de São Paulo S.A.  
Divisão de Química  
Agrupamento de Biotecnologia  
Caixa Postal 1041  
01064-970, São Paulo, SP, Brasil

**Eugênio Aquarone***Professor Titular*

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Tecnologia  
Bioquímico-Farmacêutica  
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 16  
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

**Francisco Maugeri Filho***Professor Doutor*

Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Caixa Postal 6121  
13081-970, Campinas, SP, Brasil

**Gérard Clement Chuzel***Pesquisador Visitante*

Universidade Estadual Paulista  
Centro de Raízes e Amidos Tropicais  
Caixa Postal 237  
18603-970, Botucatu, SP, Brasil

**Geraldo Lippel Sant'Anna Jr.***Professor Titular*

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
COPPE  
Caixa Postal 68502  
21945-970, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Haroldo Hiss***Pesquisador Científico*

Instituto Butantã  
Av. Vital Brasil, 1500  
05503-900, São Paulo, SP, Brasil

**Henrique Vianna de Amorim***Professor Associado*

Fermentec S/C Ltda.  
Rua Treze de Maio, 768 - salas 43/44  
13400-900, Piracicaba, SP, Brasil

# 11 PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS

*Iracema de Oliveira Moraes  
Deise Maria Fontana Capalbo  
Regina de Oliveira Moraes Arruda*

## 11.1 – Introdução

Muitas bactérias formadoras de esporos produzem moléculas importantes (solventes, antibióticos, enzimas e inseticidas), enquanto outra fração representa problema na indústria de alimentos, por produzir toxinas e apresentar esporos altamente resistentes a processos de higienização<sup>(1,2)</sup>. Do processo de esporulação resulta um endosporo dormente e altamente resistente, que sob condições favoráveis pode germinar e se transformar numa célula vegetativa. A seqüência de fases de diferenciação é caracterizada por mudanças morfológicas distintas, que podem ser representadas através da Fig. 11.1. Durante o crescimento vegetativo, as células se dividem por fissão binária. Em condições de falta de nutriente acontece a formação de um septo assimétrico (estágio Iii). O pré-esporo é então envolvido pela membrana da célula mãe (estágio Iiii e Iiiii) ficando totalmente envolvido pelo citoplasma da célula mãe (estágio III). Durante o estágio IV forma-se uma membrana externa ao pré-esporo e em seguida há formação do córtex (área sombreada). As camadas vão se depositando externamente ao córtex no estágio V. O esporo atinge sua maturação (estágio VI) e é liberado pela lise da célula mãe (estágio VII). A germinação do endosporo ocorre na presença de substâncias promotoras, o córtex é hidrolizado e o esporo germinado pode se transformar numa nova célula vegetativa<sup>(1)</sup>.

As bactérias formadoras de esporos pertencem em sua maioria à família *Bacillaceae*, incluindo cinco gêneros: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Sporosarcina*. O gênero aeróbio *Bacillus* é o maior, seguido pelo anaeróbio *Clostridium*<sup>(2)</sup>. São também essas bactérias formadoras de esporos as de maior potencial para o controle biológico, pelas mesmas características que lhes conferem resistência às condições adversas ambientais e de processamento industrial.

Nos últimos trinta anos o desenvolvimento da agricultura e a ampliação das

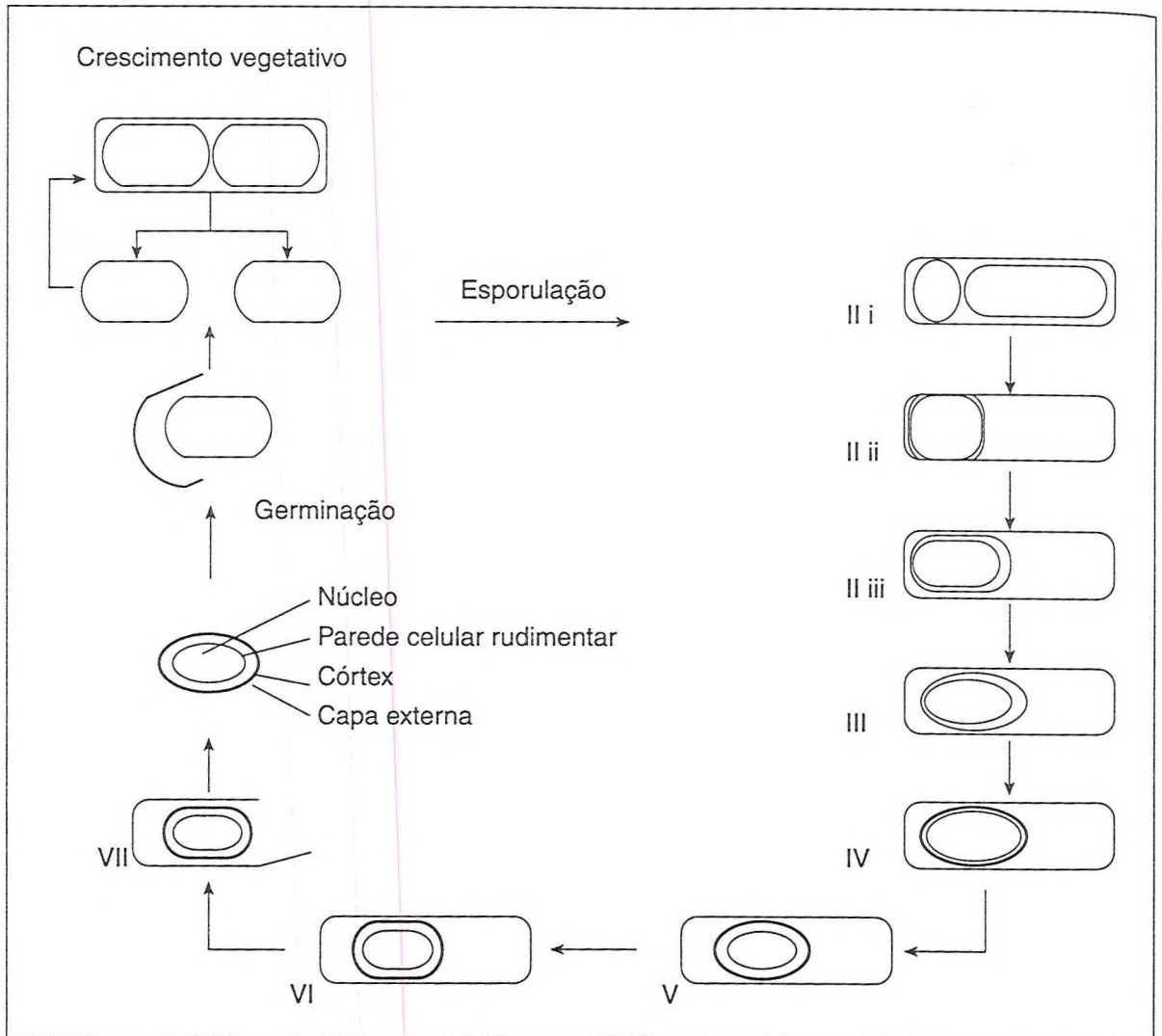


Figura II.1 — Mudanças morfológicas durante a diferenciação de *Bacillus* sp

fronteiras agrícolas obrigaram à intensificação do uso de pesticidas químicos, devido ao grande aumento do ataque de insetos, responsável por cerca de 30% de perdas em colheitas e produtos armazenados. Paralelamente a essa expansão, surgiram os problemas de toxidez, devido especialmente ao emprego indiscriminado e de resíduos que tais pesticidas deixam nas plantações. Além disso, o problema de resistência de insetos a pesticidas químicos deve ser considerado. Surgiram, então, alternativas de combate aos insetos, entre as quais o uso de feromônios e entomopatógenos, que incluem especialmente vírus, bactérias e fungos.

Os inseticidas baseados em entomopatógenos são quase sempre específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxidez aos vertebrados e insetos benéficos, ocorrendo naturalmente nos campos cultivados.

Apesar de o uso de entomopatógenos representar apenas 1% do mercado total de produtos para proteção de plantas, um número significativo de estudos promoveu

o aumento da quantidade de produtos disponíveis e ampliou as perspectivas para o mercado. Em particular, o entendimento do modo de ação de *Bacillus thuringiensis* (Bt), o ingrediente ativo mais utilizado comercialmente nos biopesticidas, cresceu pela aplicação de métodos biotecnológicos. Um recente aumento de vendas de produtos à base de Bt (em 3 anos cresceu cerca de 80%) se deve a avanços na formulação e formas de produção que geraram produtos mais econômicos, alguns dos quais competem diretamente com os químicos<sup>(3)</sup>.

A aplicação de patógenos como inseticidas requer grandes quantidades do agente ativo. Conseqüentemente, sua produção deve ser relativamente fácil e boas as características de estocagem. A produção depende do microrganismo entomopatogênico se desenvolver em meio artificial ou não. Se ele crescer em meio artificial (*in vitro*) poderá ser produzido em larga escala, utilizando-se as modernas técnicas de fermentação. Por outro lado, se o patógeno se reproduzir apenas *in vivo*, faz-se necessário o hospedeiro vivo, ou um organismo alternativo para sua multiplicação. Tal produção tornar-se-á viável pela utilização de métodos de criação de insetos, livres de doenças, geralmente alimentados com dieta artificial<sup>(4)</sup>.

Qualquer que seja o método de produção utilizado, existirão problemas de formulação e manutenção de linhagens. Os princípios e métodos de formulação de inseticidas químicos podem ser adaptados para microrganismos, porém, deve-se estar atento ao fato de que o patógeno deve ser mantido vivo e que ele é suscetível a fatores que não costumam afetar os compostos químicos, como radiação ultravioleta, temperatura e pressão durante a moagem para formulação em pó, entre outros.

A manutenção da linhagem do patógeno é geralmente de vital importância, particularmente para aqueles patógenos que perdem sua virulência com as constantes repicagens da cultura *in vitro*.

A variabilidade, mutabilidade e, algumas vezes, a facilidade de manipulação genética, são algumas vantagens dos inseticidas baseados em entomopatógenos, em comparação com os químicos. A manipulação genética dos patógenos, promovendo novas linhagens potencialmente mais ativas e a descoberta de novas espécies, induzem a perspectivas ainda mais promissoras na área. Paralelamente, o desenvolvimento de novos métodos de preservação de microrganismos favorece a manutenção de bancos desse material para futuras pesquisas e melhoramentos.

Nos últimos 40 anos o potencial para biopesticidas no mercado foi observado por diferentes ópticas, sendo que hoje são vistos não como uma panacéia, mas como um componente efetivo e de valor nos sistemas de manejo integrado<sup>(5)</sup>.

Segundo **Moraes & Capalbo**<sup>(6)</sup>, são vários os microrganismos patogênicos a insetos ou que produzem material tóxico para eles. Podem ser divididos em três grupos, com base em sua ecologia. O primeiro grupo, uma vez introduzido numa população alvo, será reciclado naturalmente, gerando um grau de controle permanente naquela população. O segundo grupo logo desaparece do ambiente ao qual foi aplicado e que deverá ser aplicado repetidamente. O terceiro grupo

pode se comportar de ambas as formas, dependendo da combinação da linhagem do patógeno com a espécie de praga visada e também do ambiente. Os agentes bacterianos de controle biológico se dividem entre os três grupos. *Bacillus popilliae* e espécies semelhantes pertencem ao primeiro grupo. Muitas variedades de Bt são do segundo grupo. O terceiro grupo envolve linhagens de *Bacillus sphaericus*. Essa lista de espécies bacterianas, embora curta, contém os mais promissores agentes de controle microbiano.

Essas espécies de bactérias possuem vantagens e desvantagens para controle de insetos. As vantagens incluem a produção de esporos, que são bastante resistentes aos fatores adversos do ambiente, podem ser mantidas na forma de pó ou emulsão, são facilmente utilizadas em equipamentos projetados para a aplicação de inseticidas químicos e, principalmente, são inócuas ao ser humano, a outros mamíferos e à flora e fauna benéficas.

Dentre as desvantagens, está o fato de as bactérias agirem por via oral, não tendo nenhuma ação por contato. Sua ação geralmente se restringe a um estágio de desenvolvimento do inseto, e por conseqüência a aplicação do produto deve ser mais exata e controlada do que com produtos químicos.

Cada um dos três grupos possui, entretanto, características particulares interessantes, que resultaram na sua utilização como meio de controle de insetos.

## 11.2 – Produção comercial

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos iniciou-se em torno de 1950, quando se percebeu a possibilidade de se manipular microrganismos para causar epizootias em insetos suscetíveis, em velocidades próximas daquelas dos produtos químicos, sem contudo causar danos às espécies benéficas.

Primeiramente, foram as empresas de fermentação que, na procura de novos mercados, se lançaram no estudo da produção de Bt, que se apresentava viável para crescimento *in vitro*. A seguir, as indústrias de produtos químicos, já estabelecidas na produção e venda de inseticidas, demonstraram interesse, devido à potencialidade que o inseticida bacteriano representava na facilidade de produção, viabilidade e eficácia para o controle de insetos. Em oposição à maioria dos pesticidas químicos, o ingrediente ativo dos produtos à base de bactérias é obtido diretamente de organismos vivos, o que implica em etapas de obtenção e utilização diferentes das rotineiramente observadas nos produtos químicos<sup>(7)</sup>.

Para a produção comercial de microrganismos ou produtos microbianos, há a necessidade de seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo e variações são necessárias a fim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições de fermentação econômicas.

Dulmage & Aizawa<sup>(8)</sup> sugeriram que Bt é um habitante de solo, e Martin & Travers<sup>(9)</sup> apresentaram resultados de isolamento de Bt do solo usando técnica até hoje aplicada para recuperação desta bactéria de diferentes habitats. Observaram



também que aproximadamente 40% das cepas de Bt isoladas, formadoras de cristal, não eram tóxicas aos insetos testados (*Bombyx mori*, *Trichoplusia ni*, *Culex pipiens*) nem tampouco a besouros. Uma revisão discutida sobre a ecologia de Bt pode ser encontrada em Meadows<sup>(10)</sup>.

Independente da fonte de obtenção da linhagem, seja ela isolada de fontes naturais como solo ou insetos, seja ela obtida por manipulação genética, todos os novos "materiais" deverão seguir etapas de otimização antes de poderem ser utilizados em fermentações de escala comercial<sup>(7)</sup>. Essas etapas envolvem a estabilidade da linhagem e as condições ótimas de produção.

Verifica-se a estabilidade da linhagem através de várias gerações de forma a demonstrar que através de multiplicações sucessivas um inóculo inicial não reverterá a um isolado menos ativo. Estudam-se as condições ótimas de produção da entidade tóxica, pois apesar de se poder contar com uma linhagem potente, existe a possibilidade das condições de fermentação alterarem drasticamente a habilidade do isolado de gerar um produto altamente tóxico. Assim, a potência e o espectro de atividade do caldo final fermentado dependem muito da qualidade e controle do processo de produção.

As etapas preliminares de otimização das condições de produção são normalmente realizadas em pequenos reatores (entre 1 e 5 litros), seguidas de etapas intermediárias (reatores entre 10 e 20 litros). Esses reatores são construídos de forma a permitir o controle, o monitoramento e o registro das condições de trabalho (temperatura, aeração, agitação, entre outras) bem como a retirada de amostras assepticamente. Desses testes obtém-se dados sobre condições ideais de suprimento de nutrientes (carboidratos, minerais, proteínas), temperatura, pH, oxigênio dissolvido, que embasarão o escalonamento do processo. Considerações do aspecto "custo de produção e recuperação do produto final" devem ser conjugadas com os dados de produtividade obtidos nas etapas de otimização do processo fermentativo de forma a gerar produtos competitivos<sup>(6,7)</sup>.

No caso do Bt a aplicação de bioensaios com o produto obtido determina a melhor linhagem. Isso envolve grande consumo de tempo, o que não é prático nem econômico, porém indispensável<sup>(11,12)</sup>.

A manutenção de culturas em meio sólido e as repetidas transferências em meio de cultura artificial causam alterações indesejáveis no microrganismo, sendo uma delas o decréscimo na capacidade de esporular, diminuindo sua patogenicidade. Essa pode ser restaurada através da passagem do microrganismo pelo inseto hospedeiro e posterior reisolamento<sup>(11)</sup>.

### 11.3. Processo fermentativo

Os processos fermentativos envolvem várias etapas na obtenção de grandes quantidades de células e/ou seus metabólitos<sup>(13)</sup>. Para Bt a forma mais usual é o processo submerso, no qual um meio nutritivo líquido é utilizado para suspender e propagar a biomassa bacteriana<sup>(6,7)</sup>.

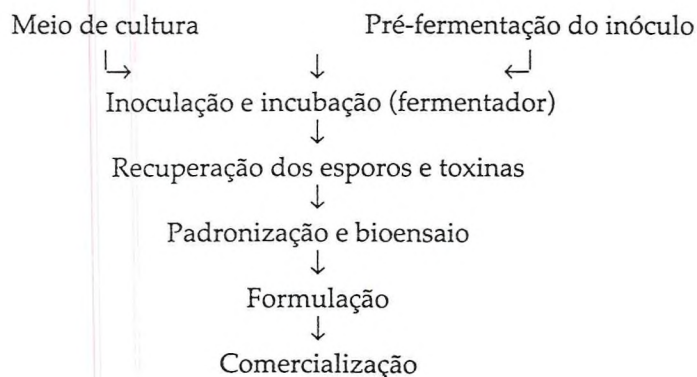
Cada linhagem é mantida como uma cultura-estoque na forma liofilizada. Uma pequena quantidade desse material pode ser transferida para um meio de propagação, por exemplo, um meio nutritivo contendo ágar. Essa etapa primeira de propagação (cultura-mãe, semente ou "starter") é utilizada para testes de pureza que incluem, por exemplo, sorotipagem, sensibilidade a bacteriófagos, observação quanto à presença de contaminantes e confirmação da atividade inseticida<sup>(7)</sup>.

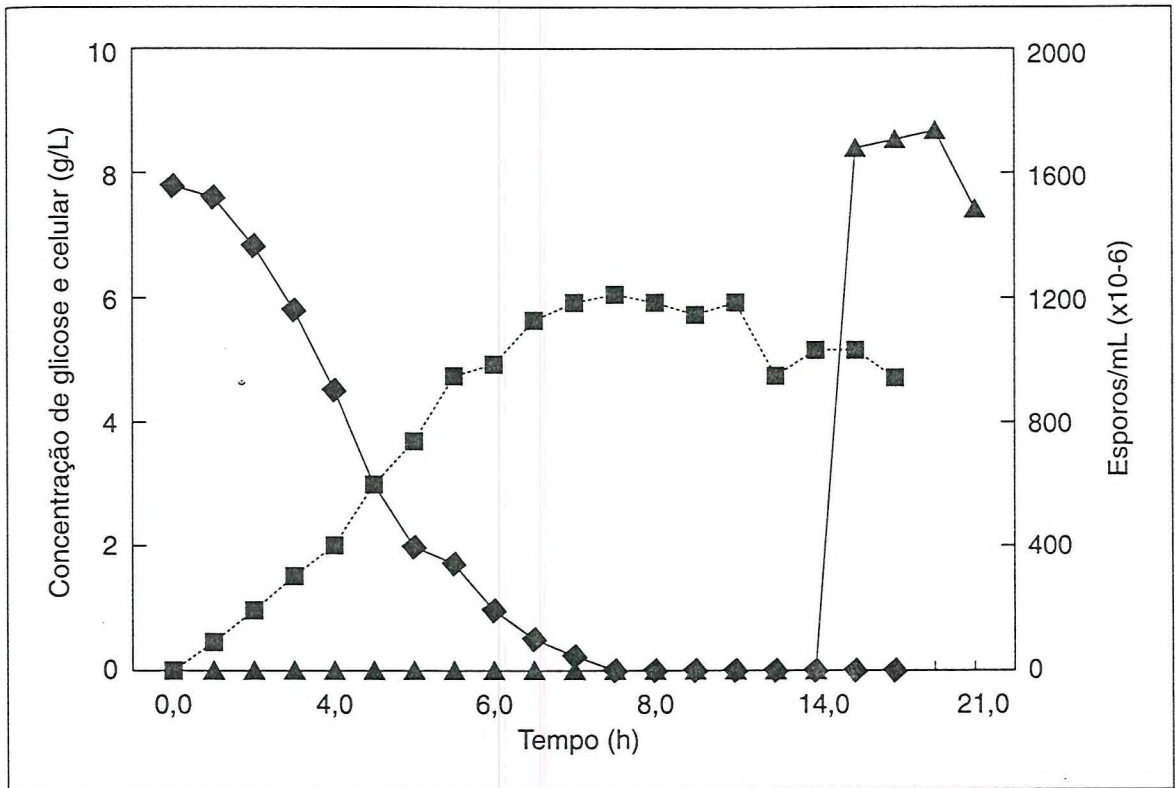
O processo de fermentação tem início quando se transfere uma pequena alíquota da cultura-mãe para um reator ou erlenmeyer (até 1 litro), que após um período de fermentação sob condições controladas será o inóculo de um reator ainda maior (50 litros), e assim sucessivamente até se atingir o volume final desejado. O volume de inóculo varia de 1 a 10% conforme as demais condições de cultivo. Condições de assepsia durante todo o procedimento devem ser observadas para evitar contaminações por outros microrganismos; todo o equipamento e meios de cultivo devem ser esterilizados em autoclave ou por vapor, de forma a manter as condições de assepsia necessárias<sup>(6,7)</sup>.

As condições de produção devem ser cuidadosamente monitoradas para segurança quanto ao andamento e manutenção da produtividade. Após o período de crescimento analisa-se o caldo quanto às propriedades físicas e microbiológicas, para assegurar qualidade e integridade antes de passar a etapas posteriores de produção, que atingirão até 10.000 litros ou mais por reator<sup>14</sup>. Até esse ponto a fermentação gerou células em estágio de crescimento vegetativo; esporos e cristais protéicos ainda não foram produzidos em quantidades significativas, como se pode observar pelos resultados experimentais apresentados na Fig. 11.2.

É no estágio final das fermentações que as fontes de nutrientes se tornam limitantes, o que promove a etapa final de esporulação, chegando-se à obtenção de um grande número de cristais e esporos. Ocorre eventualmente a lise de algumas células, liberando unidades de esporos e cristais, independentes, no meio de cultura. Dessa forma, o caldo final do reator conterá uma suspensão de células remanescentes do processo, pequenos fragmentos celulares (resultantes da lise da parede celular), além de esporos e cristais (que predominam)<sup>(7)</sup>.

Pode-se esquematizar a produção comercial de Bt por processo submerso ou semi-sólido, conforme segue<sup>(6)</sup>:





**Figura 11.2** — Alterações nas concentrações de algumas variáveis durante o cultivo de *Bacillus thuringiensis* em processo submerso descontínuo: (■) concentração celular (g peso seco/l); (◆) concentração de glicose (g/L); (▼) esporos/mL  $\times 10^{-6}$ .

### 11.3.1 – Fermentação submersa descontínua

Desde meados do século XX, todos os produtos contendo Bt têm sido obtidos por fermentação submersa, variando apenas a forma de recuperação dos esporos e a formulação final. Também *B. sphaericus* e *B. subtilis* vêm sendo estudados e produzidos nos últimos anos por esse processo.

Nas fermentações com Bt há a necessidade de altos níveis de carbono, nitrogênio e oxigênio: (a) microrganismos aeróbios como Bt apresentam elevada demanda de ar nos estágios iniciais de fermentação. É quase impossível saturar com ar caldos dessas culturas em estágio de crescimento logarítmico em fermentadores de 14 litros, mesmo com aeração de 2,0 vvm (volume de ar/volume de meio  $\times \text{min}^{-1}$ ); (b) altas concentrações de carboidratos são geralmente conseguidas a partir de dextrose ou amido. Entretanto, a partir desses carboidratos podem ser produzidas grandes quantidades de ácidos orgânicos, que irão baixar o pH do caldo a valores inferiores a 5,4, que poderá provocar a interrupção do crescimento bacteriano. A neutralização desses caldos geralmente permite que a cultura recupere seu crescimento; (c) altos níveis de nitrogênio (a partir de proteínas, hidrolisados ou água de maceração de milho) também estimulam o crescimento e promovem a liberação de bases orgânicas, que irão favorecer a manutenção do pH do caldo em níveis desejáveis<sup>(15)</sup>.

A composição do meio de cultura para fermentação deve constar de água, carbono e nitrogênio, para biossíntese e energia, e traços de minerais. Os níveis e formas desses elementos dependem do processo de fermentação usado. Assim, uma fonte de carbono apropriada para fermentação semi-sólida (farelo de arroz, tortas de oleaginosas) pode não sê-lo para fermentação em submerso (melaço de beterraba, melaço de cana, amido de cereais).

#### *Fontes de carbono e nitrogênio:*

O nitrogênio pode ser suprido com sais de amônio, água de maceração de milho e farinha de soja. **Dulmage**<sup>(16,17)</sup> estudou diferentes meios de cultura e diferentes linhagens de Bt em cultura submersa. A atividade tóxica foi dependente do meio e da linhagem empregada. Os carboidratos usados foram triptona, farinha de soja e torta de algodão parcialmente desengordurada. **Ejiofor**<sup>(18)</sup> cita que são utilizados, na Nigéria, levedura residual de cervejaria e amido residual de mandioca como substratos para crescimento de Bt.

Uma das chaves para o sucesso da produção e comercialização do inseticida bacteriano tem sido o desenvolvimento do meio de cultura. A maioria dos meios de cultura empregados usa produtos totalmente naturais como fontes de carbono, nitrogênio e sais. Conforme listados anteriormente, verifica-se serem subprodutos industriais de baixo custo.

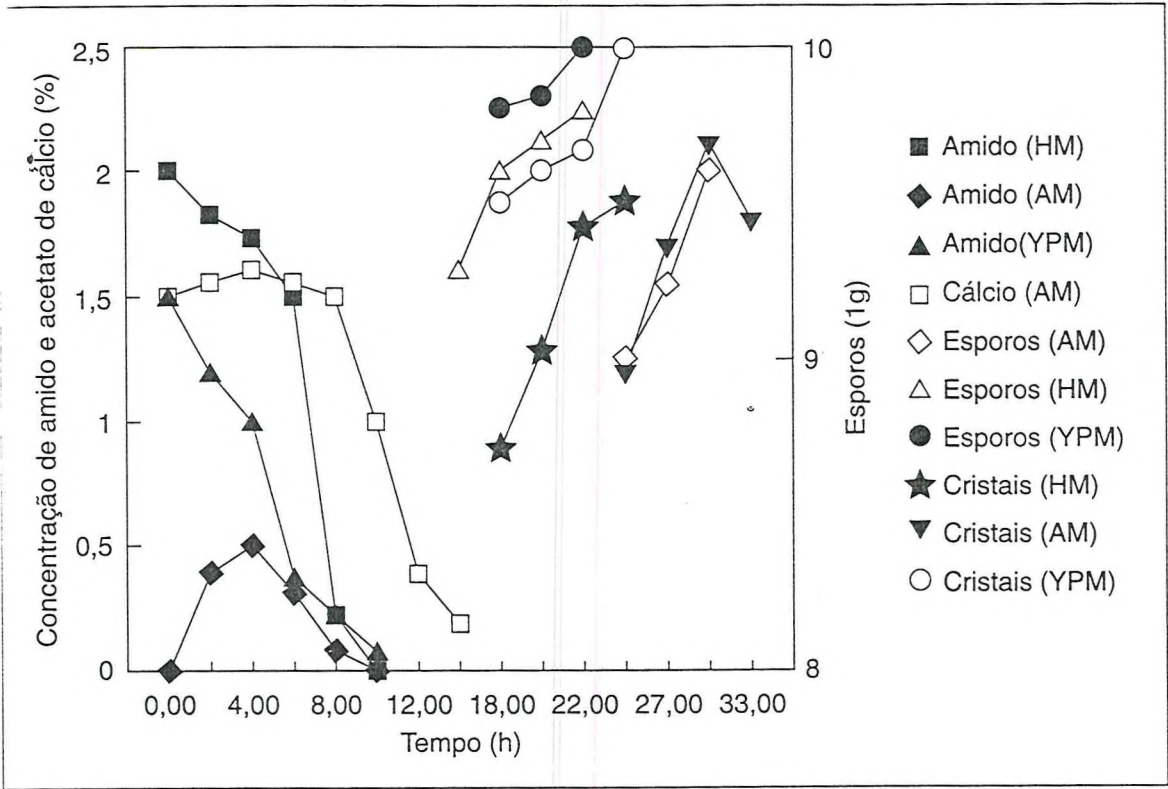
O balanço entre nitrogênio e oxigênio pode ter uma grande influência sobre o pH durante a fermentação. O pH da fermentação pode ser controlado entre 5,4 e 8,4, através do balanço de nutrientes (ácidos formados a partir dos carboidratos, e bases formadas a partir das fontes de proteína).

Segundo **Pearson & Ward**<sup>(19)</sup> há um pequeno aumento na síntese da toxina de Bt se forem utilizados meios contendo amido quando comparado com melaço. Já para fermentação de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), é interessante o suplemento do meio com sulfato de amônio<sup>(20)</sup>.

Segundo **Priest**<sup>(21)</sup>, muitos trabalhos foram desenvolvidos para atingir um meio de cultivo efetivo para uso em países em desenvolvimento. Aparentemente um meio contendo resíduos agroindustriais de geração local reduziria os custos, porém, para Bti materiais amiláceos deverão ser evitados, sendo mais recomendado sementes de leguminosas e produtos fermentados de mandioca ou milho. A versatilidade do metabolismo do Bt pode ser benéfica na exploração desse potencial de grande valor para a produção de bioinseticidas em países em desenvolvimento.

Para *B. sphaericus*, que não utiliza fontes de carbono para crescimento e não metaboliza o açúcar, são necessários acetato, succinato, arginina e glutamato com fontes de carbono e energia, sendo possível também o gluconato e o glicerol. Devido a sua fisiologia o meio de crescimento deve ser composto apenas de componentes protéicos e aminoácidos<sup>(21)</sup>.

Através da Fig. 11.3 e Tab. 11.1 (referentes ao trabalho de **Yudina et al.**<sup>(22)</sup>) observa-se claramente a influência da fonte de carbono sobre a atividade biológica e morfologia do cristal de Bt.



**Figura 11.3** — Formação de esporos e cristais durante o crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Z-52 em diferentes meios de cultura<sup>(22)</sup> — YPM = 3% nutriente extrato de levedura, 1,5% farinha de milho — AM = acetato de cálcio, levedura, farinha de milho — HM = extrato de levedura hidrolizada ( $H_2SO_4$ ) e diferentes concentrações de amido (0,5 - 2,5%)

Nesse processo, não apenas o número de cristais de diferentes formas se altera durante o crescimento em diferentes meios, como também as características morfológicas que dependem das variações nas estruturas e também das relações de composição das delta-endotoxinas, levando a alterações na magnitude e especificidade do seu efeito inseticida<sup>(22)</sup>.

Um aumento na concentração de carbono (HM) aumentou a biomassa e também a quantidade de cristal. Entretanto, sua atividade biológica permaneceu a mesma, não tendo variado tampouco as formas e as relações entre formas de cristal obtidas. Já a mudança da fonte de carbono levou a alterações nas velocidades de formação de toxinas, o que se refletiu na mudança das principais características bioativas de Bt.

Para a produção no Brasil, é interessante usar o melaço de cana e água de maceração de milho<sup>(12,23-25)</sup>. A composição do meio de cultura é determinada através da análise de custos comparada com o rendimento das frações endo e exotóxicas.

#### Sais minerais:

São também necessários sais inorgânicos para o crescimento de microrganismos, tais como cálcio, zinco, manganês e magnésio. O balanço adequado de sais

Tabela 11.1 — Principais propriedades do cristal produzido pela linhagem Z-52 em diferentes meios de cultura<sup>(22)</sup>

MEIO	HM + 0,5% de amido	HM + 1% de amido	HM + 2% de amido	AM	YPM
Comprimento do cristal ( $\mu\text{m}$ )	-	1,38	1,43	1,91	1,51
Largura da base do cristal ( $\mu\text{m}$ )	-	0,64	0,56	0,83	0,68
Dimensão do cubo	-	0,64	0,58	0,81	0,64
Volume dos cristais bipiramidais ( $\mu\text{m}^3$ )	-	0,19	0,15	0,44	0,23
Volume dos cristais cubóides ( $\mu\text{m}^3$ )	-	0,26	0,20	0,53	0,26
Concentração do cristal (mg/ml)	0,5	1,2	1,9	2,9	3,1
Atividade antibacteriana específica do cristal (U/ml)	2,3	2,2	2,0	9,0	6,7
Atividade antibacteriana geral do cristal (U/ml)	1,2	2,6	3,8	26,0	20,8
Número de esporos ( $\times 10^9$ / ml)	1,8	2,8	4,2	7,3	4,7
Atividade inseticida ( $\times 10^6$ esporos /ml)	-	7,7	-	1,7	2,4

"-" = não determinado

minerais auxilia no equilíbrio do pH do caldo de fermentação, o que é de extrema importância na produção e posteriores recuperação e estabilidade da toxina ou produto final desejado<sup>(15)</sup>. O cálcio, segundo **Dulmage & Rhodes**<sup>(11)</sup>, é necessário para a termoestabilidade dos esporos de Bt, enquanto que o manganês é requerido para a esporulação.

**Sikdar et al.**<sup>(26)</sup>, estudando o efeito de alguns minerais sobre o crescimento de Bti, verificaram que as concentrações ótimas de minerais para o crescimento e produção de endotoxinas são diferentes, não havendo relação entre crescimento celular e produção de toxina. Entre os elementos estudados (potássio, magnésio, cálcio, ferro, cobre e molibdênio), apenas o molibdênio provocou inibição.

#### Temperatura:

Como determinado por **Dulmage**<sup>(15)</sup> e apresentado na Tab. 11.2, crescimento e rendimento não variam muito entre temperaturas de 26°C até 34°C. A 37°C exames ao microscópio mostraram presença de longos cordões de células e baixos rendimentos. Não existe vantagem em crescer Bt em temperaturas acima de 34°C para produção comercial, pois além do risco de menor rendimento, existe o custo da energia a ser acrescido.

#### Oxigênio:

Entre os diferentes trabalhos já realizados sobre a influência do oxigênio na esporulação de Bt, o de **Tianjian et al.**<sup>(27)</sup> demonstra bem a influência dos diversos

Tabela 11.2 — Efeito da temperatura de incubação no crescimento e produção de delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* variedade HD 263 em fermentador de 14 litros<sup>(15)</sup>.

Temperatura de incubação (°C)	Tempo para obter o máximo rendimento (h)	Esporos (x10 <sup>7</sup> )	Potência observada (kIU/ml)*
37	39 — 42	80	283
34	18 — 24	170	1.150
30	34 — 39	220	1.500
30	39	240	1.450
26	39 — 42	200	1.630

\* Medido contra *Heliothis virescens*; kIU = Unidades Internacionais x 10<sup>3</sup>

fatores que promovem a dissolução do oxigênio no meio de fermentação. A Fig. 11.4 mostra essas relações e sua influência sobre a concentração de células no meio fermentado.

Avignone-Rossa *et al.*<sup>(20)</sup> observaram a influência do oxigênio sobre a formação de endotoxinas de Bt. Apesar da esporulação e síntese de endotoxinas serem ambas grandemente afetadas pelo suprimento de O<sub>2</sub>, uma vez iniciada a esporulação ela será completada, mesmo que o fornecimento de oxigênio seja interrompido. Entretanto, a síntese de endotoxina é afetada por tal interrupção e apenas uma fração do rendimento esperado será atingida. Assim, o oxigênio deve ser continuamente supri-

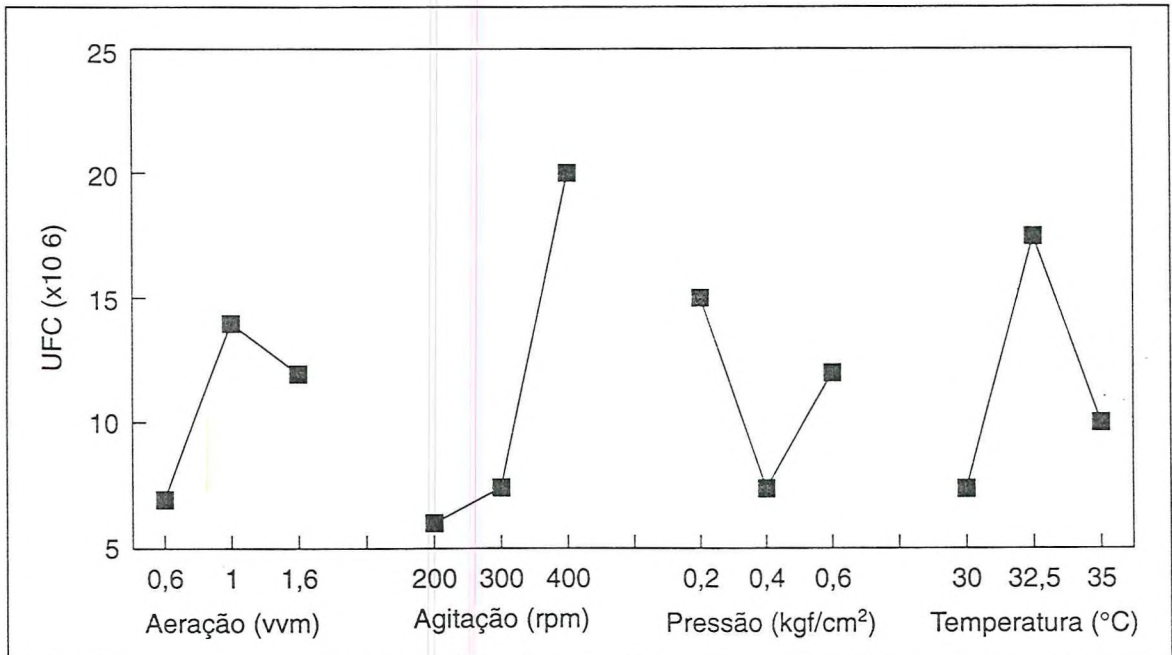


Figura 11.4 — Relação entre UFC (unidades formadoras de colônia) e cada um dos quatro fatores que influenciam na quantidade de oxigênio dissolvido no meio de fermentação<sup>(27)</sup>.

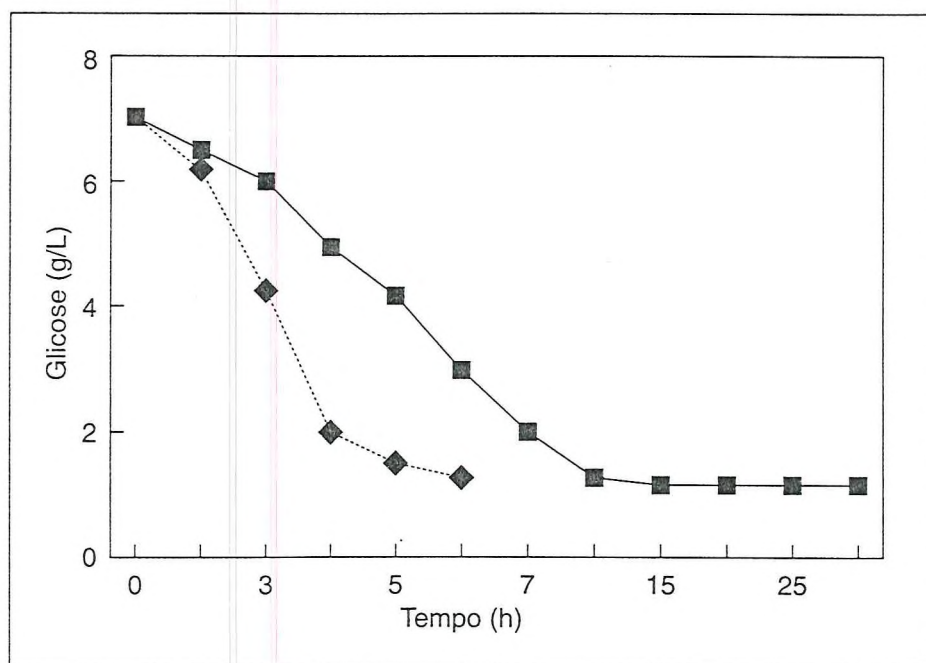
do se for desejado atingir um alto rendimento em endotoxinas, principalmente quando se lembra que a endotoxina é responsável por grande faixa de atividade do Bt.

#### Operação e acompanhamento:

As condições de operação comumente utilizadas industrialmente, descritas por vários autores, indicam um pH inicial de 7,2 a 7,6 para o meio de fermentação. O volume de inóculo varia de 2 a 10% do volume total de fermentação, sendo esse inóculo obtido de pré-fermentação de forma a garantir que o microrganismo esteja em fase de crescimento logarítmico. A temperatura utilizada é de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  e a aeração é variável com o tipo de fermentador. O ciclo de fermentação pode variar de poucas horas (8 a 10 horas) até 3 dias.

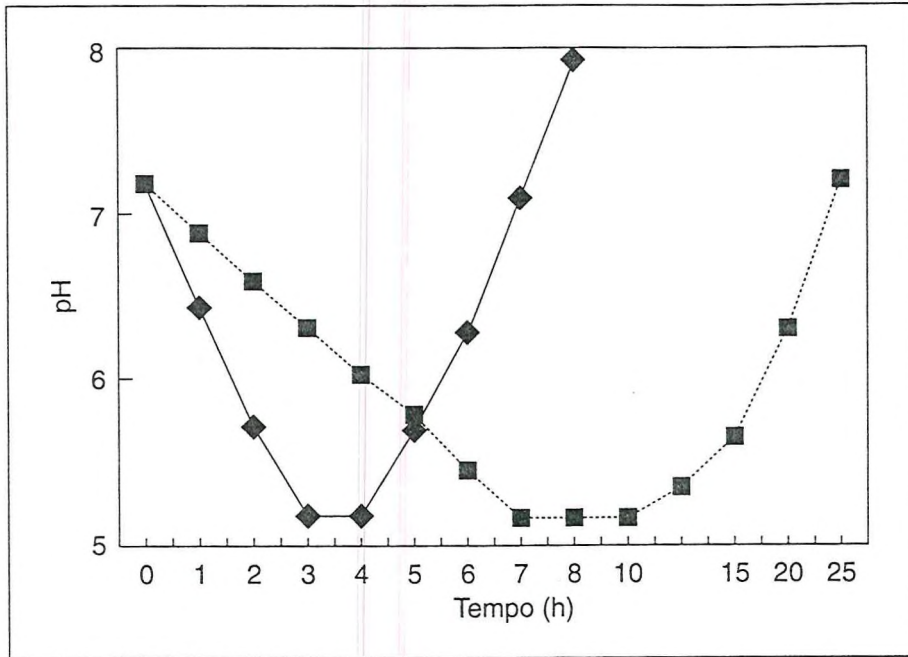
O comportamento característico da fermentação descontínua de Bt em meio de cultura com melaço e água de maceração de milho está representado nas Figs. 11.5, 11.6 e 11.7, para consumo de glicose, variação de pH e cinética de crescimento, em dois tipos de fermentador.

Tianjian *et al.*<sup>(28)</sup> demonstraram a aplicabilidade de outros parâmetros para acompanhamento de fermentações de Bt, como: conteúdo total de ácidos nucléicos, oxigênio dissolvido, conteúdo de aminoácidos, conteúdo de amônia, proteases extracelulares e, finalmente, viscosidade do meio. O conteúdo de ácidos nucléicos total reflete a concentração de células, sendo um método rápido e preciso para acompanhamento do processo fermentativo.

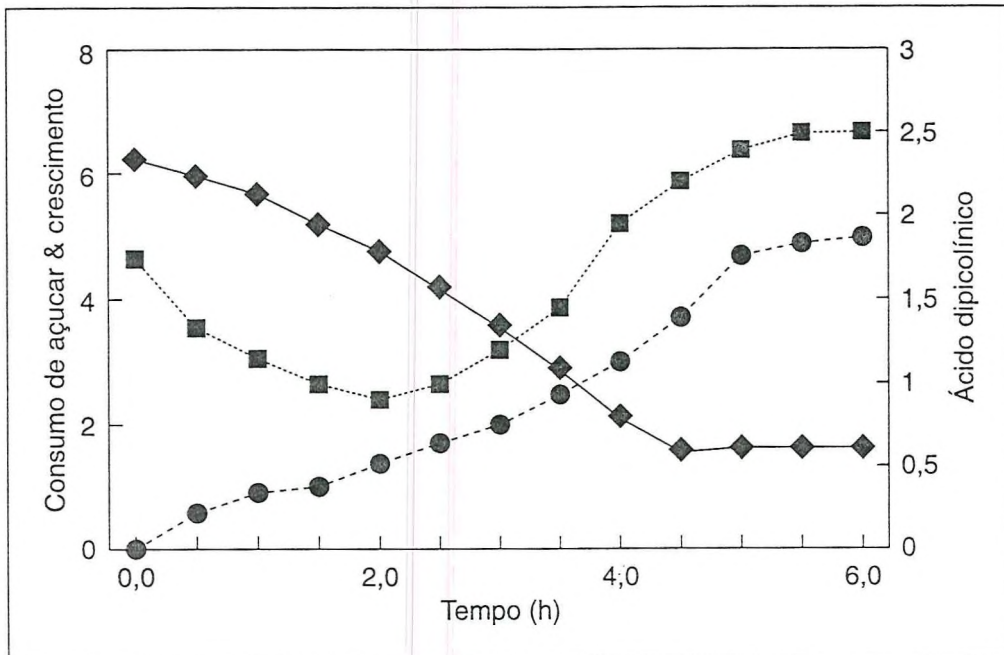


**Figura 11.5** — Cinética de consumo de açúcar para *Bacillus thuringiensis* em duas escalas de fermentação: (■) fermentador de 1 L; (◆) fermentador de 20 L





**Figura 11.6** — Variação de pH em fermentação de *Bacillus thuringiensis* para diferentes volumes de fermentação: (■)fermentador de 1 L; (◆)fermentador de 20 L



**Figura 11.7** — Cinética da fermentação de *Bacillus thuringiensis* em fermentador de 20 litros: (■)ácido dipicolínico(mg/g células); (◆)glicose (g/l); (●)biomassa (g/l).

### 11.3.2 – Fermentação submersa contínua

A maioria dos processos industriais atualmente conhecidos diz respeito à técnica de produção do inseticida microbiano “em descontínuo”, ou também

denominada “em bateladas”. Conhecidas as condições ótimas para tal técnica, pode-se empregá-las num processo contínuo. Na cultura contínua, as condições de equilíbrio do sistema podem ser manipuladas, de forma a permitir um estudo profundo da cinética do crescimento do microrganismo e dos produtos de seu metabolismo.

Apesar de a técnica de cultura contínua ter sido alvo de muitos ensaios e utilizada com sucesso para fermentações industriais, o uso de cultura contínua para microrganismos esporuláveis é raro. Alguns trabalhos indicam que variações na velocidade de crescimento e no teor de carboidratos do meio poderão acelerar a esporulação.

**Blokina et al.**<sup>(29)</sup> estudando processo contínuo de Bt verificaram que o crescimento em processo contínuo favorece a formação e desenvolvimento de colônias distintas da colônia mãe.

**Freiman & Chupin**<sup>(30)</sup> estudando o processo em dois estágios obtiveram uma cultura com máxima maturação, sendo que o segundo estágio atuou como fermentador descontínuo.

**Capalbo**<sup>(31)</sup> verificou que para condições de laboratório, a fermentação contínua com Bt é bem sucedida para sistemas com mais de um estágio, sendo a diminuição da aeração do último estágio do processo um fator econômico importante.

**Sachidanandham et al.**<sup>(32)</sup> realizaram estudo sobre a otimização de parâmetros do processo fermentativo, visando uma produção industrial de Bt, e utilizaram dados da fermentação contínua para estabelecer os dados de escalonamento. A produção em descontínuo foi realizada em fermentador de 3.000 L, com a obtenção de um produto efetivamente ativo.

### 11.3.3 – Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida (FSS) ou no “estado sólido”, como é muitas vezes designada, é um sistema de produção alternativo para obtenção de novas substâncias ou mesmo algumas já conhecidas, a partir de microrganismos que se desenvolvem na superfície de substratos sólidos. Uma enorme gama de produtos pode ser obtida (como cogumelos, alimentos orientais, enzimas, etc.). O desenvolvimento de FSS foi realizado desde há muitos séculos, especialmente no Oriente, tendo geralmente um fungo como microrganismo, conhecido como método Koji. Uma revisão bastante interessante foi realizada por **Hesseltine**<sup>(33)</sup> tratando de “um milênio de fungos: alimento e fermentação”.

Várias características intrínsecas ao processo foram extensivamente revisadas<sup>(34,35)</sup>, sendo interessante resumir que do ponto de vista da engenharia de processos, a FSS oferece características atrativas como processo alternativo da fermentação submersa: meio de cultura muitas vezes natural e simples, utilizando resíduos agroindustriais e aeração facilitada pelos espaços vazios entre partículas do substrato.

Lonsane *et al.*<sup>(36)</sup> revisaram os equipamentos necessários, o processo de monitoramento e controle, e aspectos da automação e modelagem, tendo recomendado o estudo de alguns aspectos de engenharia, pesquisa e desenvolvimento.

Na FSS produtos de origem agrícola são geralmente utilizados como suporte para o crescimento microbiano, sendo que os microrganismos crescem internamente no substrato, em sua superfície e nos espaços intersticiais. Como o microrganismo está intimamente ligado ao suporte, muitas vezes é difícil avaliar sua massa diretamente<sup>(37)</sup>. Por isso muitas vezes se avalia crescimento microbiano através de consumo de  $O_2$  ou produção de  $CO_2$ <sup>(34)</sup>.

A estrutura dentro do fermentador muda com o tempo em diferentes níveis: no nível intraparticular, o microrganismo invade os poros disponíveis e modifica a composição química do suporte; em nível interparticular o crescimento provoca o recobrimento da superfície do suporte e no caso de fungos, o micélio liga as diferentes partículas. Essa modificação induzida pelo microrganismo leva a modificações nos coeficientes de transferência gasoso e de massa.

Num estudo sobre difusão de  $CO_2$  e  $O_2$  em FSS, Auria *et al.*<sup>(38)</sup> avaliaram as alterações nos coeficientes de difusão durante a realização da fermentação. Para fins de ilustração, apresentamos na Fig. 11.8 os resultados para massa seca obtidos por Auria *et al.*<sup>(38)</sup>.

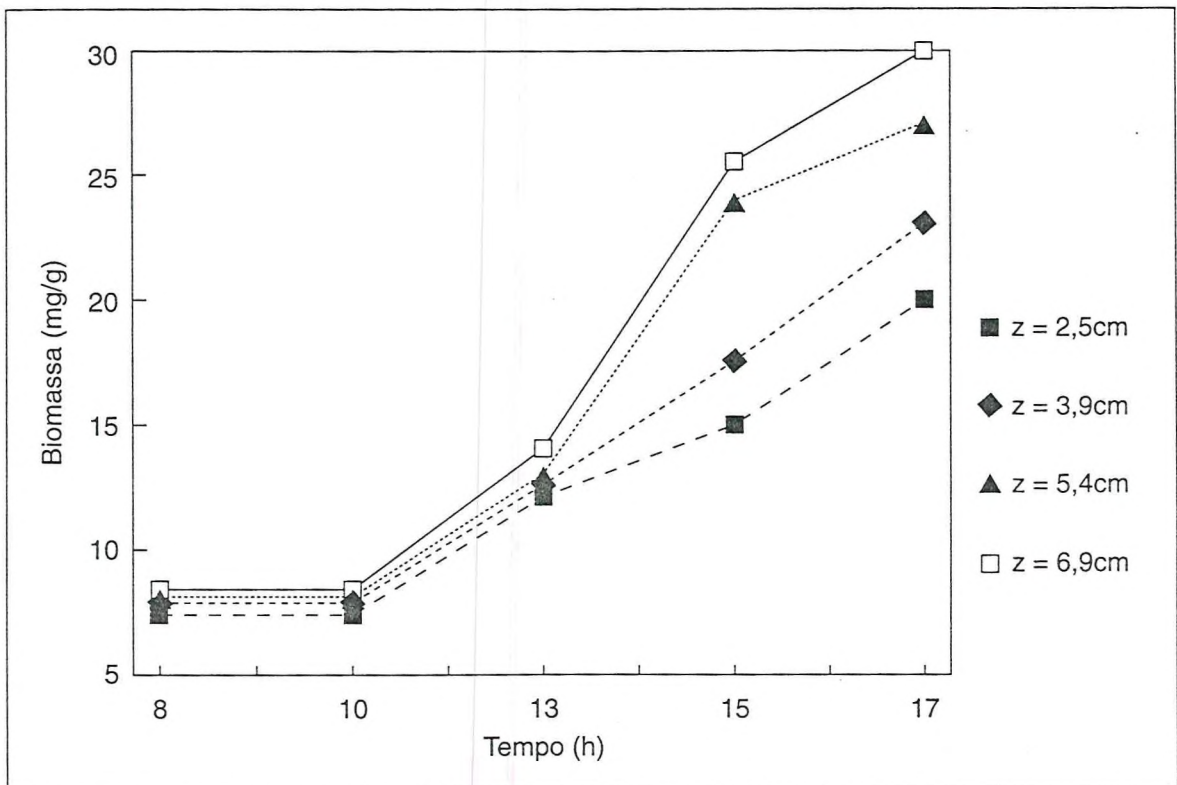


Figura 11.8 — Variação da concentração de biomassa seca com o tempo em diferentes alturas da camada do meio semi-sólido, sendo  $Z=0$  o topo da camada<sup>(38)</sup>

Esses autores ressaltaram a importância que as variáveis macroscópicas (tamanho coluna, forma, distribuição de tamanho de partícula do substrato, pressão de enchimento do reator) podem ter sobre as taxas e coeficientes de difusão, e portanto sobre os resultados de biomassa obtidos.

Outro fator importante é a transferência de calor devido ao aumento da temperatura resultante do desenvolvimento do microrganismo.

Como processo, a FSS é muito complexa devido à heterogeneidade do sistema, tanto do ponto de vista físico como químico e biológico.

## 11.4 – Separação de toxinas

De acordo com Heimpel<sup>(39)</sup>, o Bt possui um verdadeiro arsenal de toxinas: alfa, beta, gama e delta.

Durante a esporulação, forma-se ao lado de cada esporo um cristal protéico (delta-endotoxina), tóxico para a maior parte de lepidópteros, causando paralisia intestinal e morte do inseto. Em alguns casos em que o inseto parece não ser suscetível ao cristal tóxico, a ingestão deste com o esporo acarreta germinação dos esporos e produção de uma fosfolipase C, que mata o inseto hospedeiro<sup>(23)</sup>.

Além dessas endotoxinas, há a exotoxina termoestável (beta-exotoxina) descoberta por McConnell; Richards<sup>(40)</sup>, que é produzida pelo Bt na fase de crescimento vegetativo, e que é tóxica a alguns lepidópteros, dípteros, himenópteros, coleópteros e ortópteros.

### 11.4.1 – Delta-endotoxina

É a principal toxina, conforme De Barjac & Burgerjon<sup>(41)</sup>, componente do cristal protéico, sendo sua potência (dose letal média -  $DL_{50}$ ) para *Pieris brassicae* da ordem de 0,25 g/g de inseto.

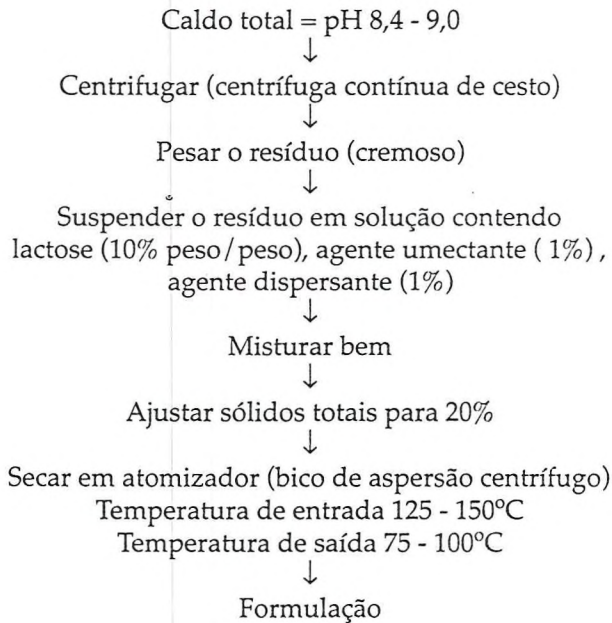
Megna<sup>(42)</sup>, em sua patente, indica a separação da endotoxina por filtração do mosto fermentado, com auxílio de filtração (Celite 512). Estabelece que qualquer desequilíbrio do suprimento de nitrogênio e carboidrato ao meio de cultura resultará na esporulação incompleta, germinação de esporos e/ou autólise, tornando a separação por filtração mais difícil.

Também já se executou a centrifugação do mosto, e o creme obtido (esporos + cristais) foi suspenso em solução 4 a 6% de lactose e precipitado com acetona. Esse precipitado, filtrado, lavado com acetona e água, foi seco. A potência do sistema foi testada em bioensaios<sup>(11,43)</sup>.

Qualquer que seja a forma de separação desejada ou possível, ela envolverá etapas de purificação e concentração do caldo fermentado, uma vez que este contém água, remanescentes do meio de cultura (sólidos e material dissolvido), fragmentos celulares e os esporos e cristais. Essa separação é uma outra etapa crítica no desenvolvimento do processo produtivo, pois nela a potência do produto pode ser reduzida, caso o desenho aplicado à separação não seja adequado<sup>(7)</sup>.

Para secagem em atomizadores quando volumes maiores que 10 litros devem ser manipulados, **Dulmage**<sup>(15)</sup> sugere o seguinte esquema:

Separação do complexo esporo-cristal de Bt para produção em escala piloto<sup>(15)</sup>



**Moraes**<sup>(44)</sup> estudou os parâmetros termobacteriológicos para o Bt, em ensaios de laboratório, visando a definição dos processos de secagem do biopesticida em escala piloto. Com a pasta centrifugada, obtida da fermentação submersa, acrescentou argila como material inerte e este pré-formulado foi submetido a secagem usando diferentes secadores. A secagem realizada em secador convencional a 90°C apresentou valor de D (índice de redução decimal) de 5,84 horas. A secagem realizada em atomizador a 120, 150 e 180°C apresentou respectivamente 9,49s, 5,88 s, 3,43 s de valor D, e valor z (coeficiente térmico) de 135,16°C. A viabilidade relativa foi mantida a 50 e 70°C, e sofreu redução a 90°C em secador convencional. No atomizador a viabilidade relativa decresceu com elevação da temperatura de 120 a 180°C.

#### 11.4.2 – Betaexotoxina

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

Em entomologia definem-se as endotoxinas produzidas pelos microrganismos entomopatogênicos como sendo aquelas toxinas ligadas à célula microbiana, enquanto que as exotoxinas são aquelas excretadas no meio de cultura. Nesse sentido, a toxina termoestável de Bt é definida como exotoxina.

**McConnel & Richards**<sup>(40)</sup> verificaram que o sobrenadante autoclavado, separado do mosto fermentado de Bt, era tóxico quando injetado em larvas de *Galleria mellonella*, tendo obtido valores de DL<sub>50</sub> como 0,3 µl/larva ou 2 µl/g de larva. Insetos de outras espécies, *Ostrinia nubilalis*, *Sarcophaga bullata* e baratas das espécies *Periplaneta americana* e *Blata orientalis*, também apresentaram suscetibilidade em testes de injeção de toxina. A adição de exotoxina em dieta alimentar desses insetos apresentou resultado negativo.

**Burgerjon & De Barjac**<sup>(45)</sup> relataram sobre a toxicidade do sobrenadante autoclavado quando ministrado oralmente a alguns insetos da ordem Lepidoptera (*Bombyx mori*, *Pieris brassicae*, *Malacosoma neustria*, entre outros), Coleoptera (*Leptnotarsa decemlineata*) e Hymenoptera (*Pristiphora pallipes*).

Da mesma maneira, **Briggs**<sup>(46)</sup> verificou que o sobrenadante esterilizado de mosto bacteriano filtrado inibia o desenvolvimento da larva da mosca doméstica. O termo "fly toxin" ou "fly factor", fator responsável pelo vôo do inseto, foi então adotado para descrever a entidade tóxica responsável, visto que o inseto quando não morria, tinha suas asas deformadas, além de outros defeitos teratológicos.

Simultaneamente, foi demonstrado por diferentes autores que produtos comerciais obtidos de Bt podiam ser ministrados a galinhas e vacas, sendo que a exotoxina remanescente nesses produtos mantinha sua atividade tóxica, atuando contra moscas cujas larvas ou pupas infestavam as fezes desses animais, exercendo assim um controle sobre os insetos que viriam a desenvolver-se<sup>(47)</sup>. Não sabiam se a exotoxina passava intacta através do trato intestinal do animal, ou se os esporos do Bt contidos no complexo esporo-cristal tóxico, passando intactos, germinavam nas fezes produzindo novas quantidades de exotoxina<sup>(48)</sup>.

Estudo sobre o efeito da exotoxina em *Anagasta kuehniella* foi desenvolvido por **Yamvrias**<sup>(49)</sup>. Sua pesquisa com o sobrenadante do mosto fermentado demonstrou atividade tóxica tanto injetado como na alimentação da larva. Comparou a velocidade de ação do componente tóxico obtido de duas variedades diferentes de Bt limitando-se, no entanto, a um número pequeno de insetos; houve uma alta mortalidade no lote testemunha que prejudicou mas não invalidou seus resultados.

**Sebesta**<sup>(50)</sup> afirma que a produção da exotoxina se dá durante a fase exponencial do crescimento, completando-se na esporulação. A Fig. 11.9 ilustra essa produção, sendo a exotoxina denominada thuringiensina. É interessante observar que a concentração de thuringiensina diminui na célula bacteriana entre nove e dezesseis horas, enquanto aumenta a concentração no sobrenadante da cultura.

Segundo **Faust**<sup>(52)</sup>, normalmente a variedade *thuringiensis* produz concentração aproximada de 50 mg de exotoxina por litro do sobrenadante separado do mosto fermentado. Essa separação se faz por centrifugação, com posterior esterilização a 121°C, por 15 minutos, do fluido resultante. A purificação se faz por adsorção da exotoxina em carvão com posterior eluição com solução de etanol a 50%. O eluído é concentrado e cromatografado em papel, ou fracionado usando Dowex 1 em coluna. Após eluição com formiato de amônia 0-1,5 M, efetua-se a dessalinização em Sephadex e o produto resultante é empregado em bioensaio para determinação da toxicidade.

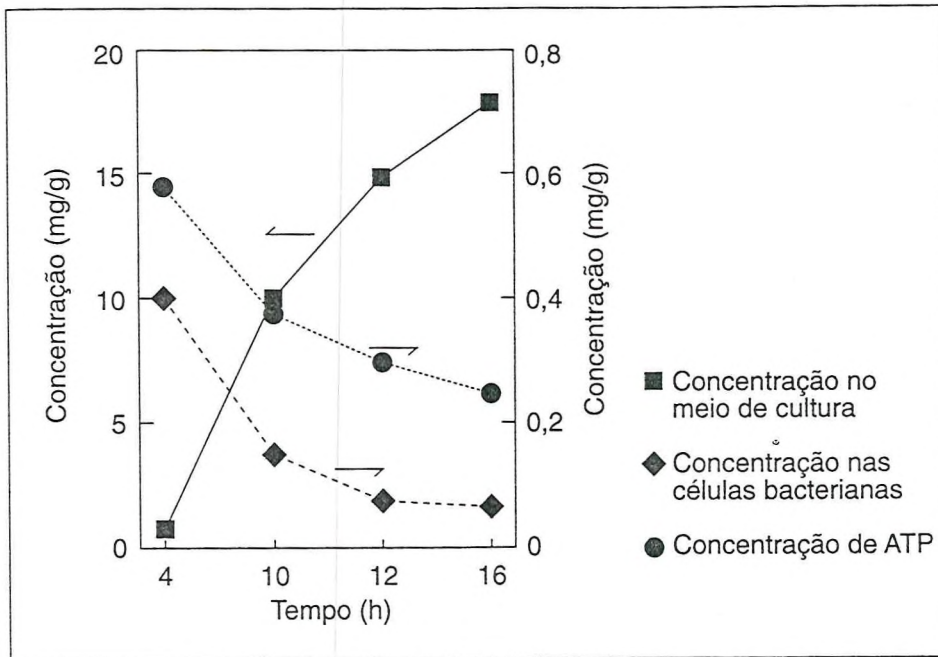
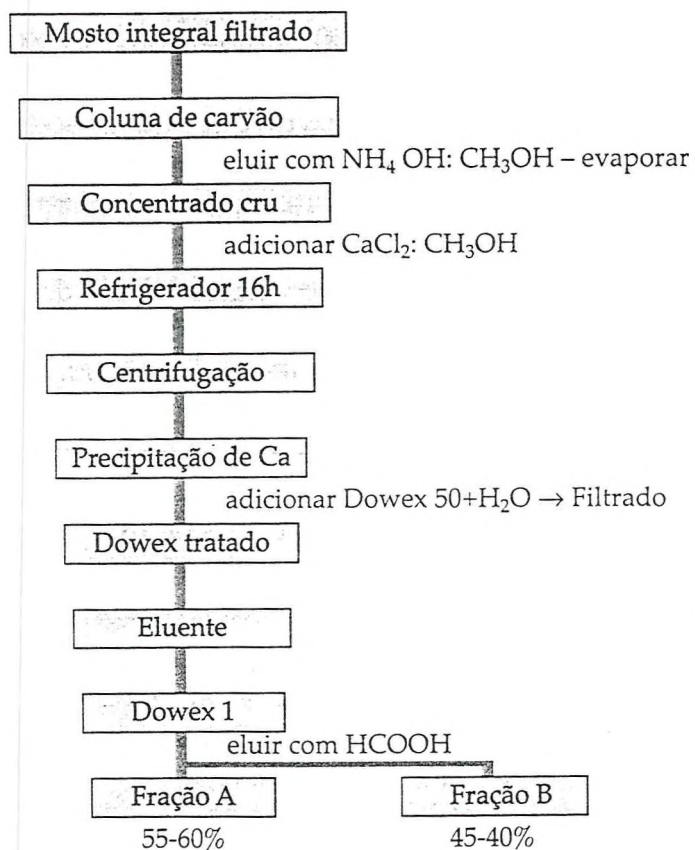


Figura 11.9 — Concentração de thuringiensina e ATP durante fermentação de *Bacillus thuringiensis*.

Kim & Huang<sup>(51)</sup> descreveram o processo usado para isolar exotoxinas puras de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* como mostra o fluxograma que segue:



No Brasil, o estudo do desenvolvimento da exotoxina de Bt foi realizado por Moraes<sup>(48)</sup>, e o produto foi testado contra algumas espécies de moscas com bons resultados. Foi depositada patente do processo e esta recebeu o Prêmio Governador do Estado em 1985, tendo sido citada em dois livros internacionais que tratam de mulheres inventoras<sup>(53,54)</sup>.

## 11.5 – Ensaio e formulação

Com inseticidas químicos, a produção pode ser bem controlada, pois a normalização desses produtos pode ser expressa em porcentagem de ingredientes ativos, já que os mesmos são quimicamente definidos e seus efeitos bem determinados<sup>(41,55)</sup>. Já os produtos de Bt poderão conter até três princípios ativos (esporo, cristal e exotoxina) necessitando de bioteste: contagem de esporos (método presuntivo) e bioensaios com insetos (conclusivo), para determinar a potência do produto. A contagem de esporos ou de cristais como único método, não tem relação com a atividade da toxina, uma vez que o processo de obtenção pode modificar a atividade dos componentes tóxicos<sup>(56)</sup>.

O caldo fermentado deve ser estabilizado antes de ser utilizado, de forma a não perder a potência. Assim, a remoção de fragmentos celulares e compostos intermediários da fermentação que podem “desativar” o composto tóxico, é feita através de lavagens e centrifugações sucessivas da biomassa com soluções de pH controlado (entre 7 e 8) permitindo a limpeza e estabilização das unidades tóxicas. Ao mesmo tempo, a redução do líquido em que esteve suspensa a biomassa, aumenta a potência do caldo total. O controle de qualidade é vital durante esse procedimento, pois minimiza variações inevitáveis que podem ocorrer com o processo biológico<sup>(7)</sup>.

De acordo com normas nacionais e internacionais<sup>(57,58)</sup>, um pesticida para ser registrado necessita apresentar resultado oficial de dosagem de ingrediente ativo. Nos Estados Unidos estabeleceu-se em 1971 o uso de Unidades Internacionais (UI) para expressar a potência dos produtos à base de Bt, sendo para isso necessária uma preparação padrão. A primeira preparação fornecida pelo Instituto Pasteur, na França foi designada E-61, continha Bt var. *thuringiensis*, e a sua potência verificada em bioensaio contra *Trichoplusia ni* (Hubner), foi atribuído o valor arbitrário 1.000 UI/mg. Esse padrão existe até hoje no Instituto Pasteur, tendo sido utilizado para padronizar os padrões 1-S-1971 e 1-S-1980, ambos obtidos a partir de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, e com potências de 18.000 e 16.000 UI/mg, respectivamente. Para Bti produziram-se dois padrões IPS-78 e IPS-80, que não se mostraram estáveis, tendo sido substituídos pelo IPS-82 com potência 15.000 UI/mg.

Os bioensaios de padronização nesse caso podem ser realizados segundo protocolos da Organização Mundial da Saúde (OMS) ou do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Com o surgimento de variedades ativas contra outros insetos, as normas de registro estão sendo revisadas, sendo que se observa nos rótulos atualmente as Unidades Internacionais acompanhadas da % em peso do ingrediente ativo (esporo+cristal)<sup>(57,59)</sup>.



Alguns autores apontam ainda a impossibilidade de se ter inseto padrão internacional, por dificuldades da legislação de alguns países que exigem quarentena. Por outro lado, é questionável se é melhor usar um inseto teste ou vários, a fim de obter uma útil complementação de informações. Além disso, para se obter resultados reprodutivos, é preciso ter uniformidade dos insetos (idade e peso), constância de fatores climáticos e quantidade de alimento administrado.

De **Barjac & Burgerjon**<sup>(41)</sup> afirmam que na rotina industrial a constância de características do produto deve ser verificada através de amostra referência, sendo que cada produtor terá seu próprio padrão de qualidade.

Para a exotoxina, **Burgerjon**<sup>(60)</sup> comenta a menor relação existente entre a contagem de esporos e a toxina termoestável do que para a endotoxina. Ele propõe a utilização de uma amostra-padrão para que o produtor padronize seu produto por referência, usando o inseto teste preferido.

De **Barjac & Lecadet**<sup>(61)</sup> apresentam uma metodologia para a dosagem bioquímica da toxina, utilizando os substratos usados para a dosagem de RNA-polimerase, afirmando haver uma boa correlação entre este e o método de aplicação de bioensaio.

## 11.6 – Comercialização e aplicação

Muitas revisões mostram que cerca de 2/3 de todos os pesticidas químicos comercializados nos Estados Unidos são objeto de preocupação quanto à segurança alimentar. Essa ansiedade pode ser o incentivo perfeito para aumentar o mercado dos pesticidas não químicos. Mesmo assim apesar das perspectivas otimistas, os volumes e valores dos biopesticidas se mantêm pequeno (US\$ 75 milhões - 100 milhões) representando menos de 1% do mercado mundial de pesticidas químicos (entre US\$20 e 25 bilhões). No passado muitos produtos biológicos não se mostraram efetivos, além de serem mais caros que os químicos. Recentemente os produtos melhoraram seu desempenho e estão bem mais baratos, o que promoveu o crescimento do mercado.

Atualmente o mercado está representado por três grandes grupos de produtos, conforme Fig. 11.10.

Como se pode observar, a grande fatia de mercado cabe atualmente aos produtos à base de Bt. A distribuição desses produtos no mercado mundial, no ano de 1992 é apresentada na Fig. 11.11

Após muitos anos mantendo-se em níveis de US\$ 20-25 milhões, nos últimos 6 anos o mercado aumentou aos níveis já citados, e deverá crescer mais pela entrada de novas companhias no setor. Observa-se entretanto que apesar dos produtos à base de Bt terem baixado seus preços (em função da competição de mercado) e conseqüentemente aumentado o volume de vendas, o mercado total se manteve estável. Também contribuíram as variações sazonais nas manifestações de pragas nos mercados principais de Bt (floresta, algodão e brassica), causando variações imprevisíveis no mercado anual. Esses fatores podem levar a erros nas previsões

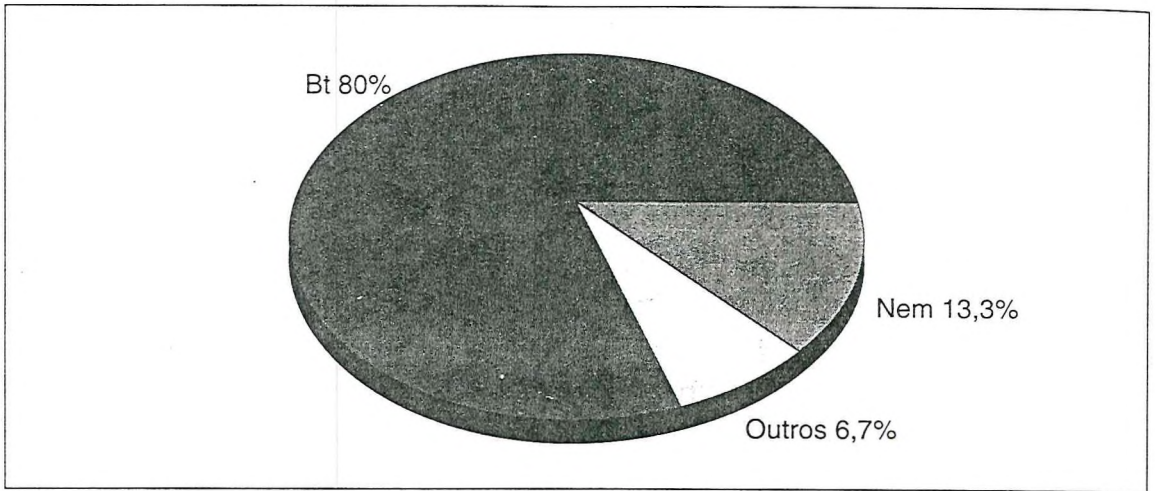


Figura 11.10 — Divisão do mercado mundial de biopesticidas

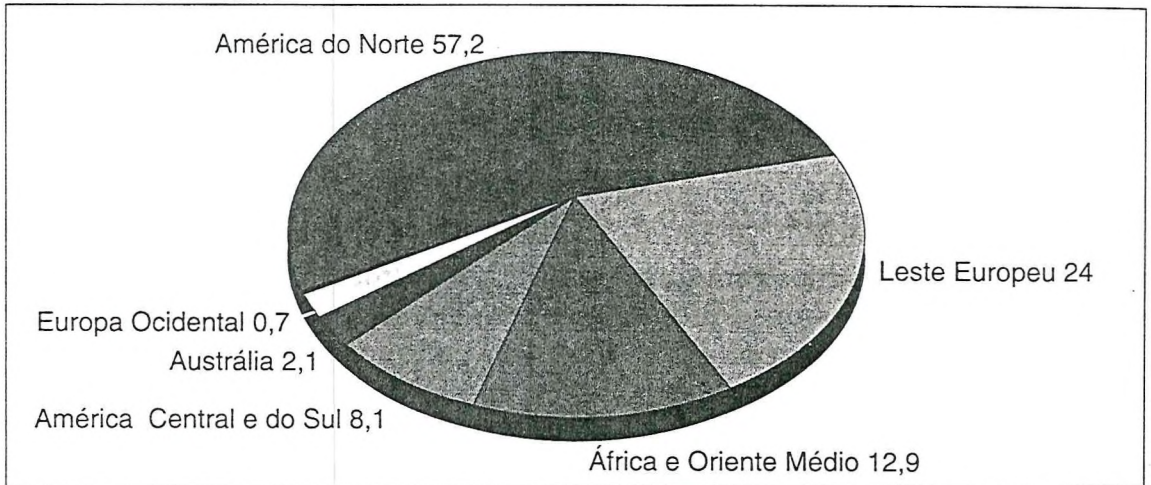
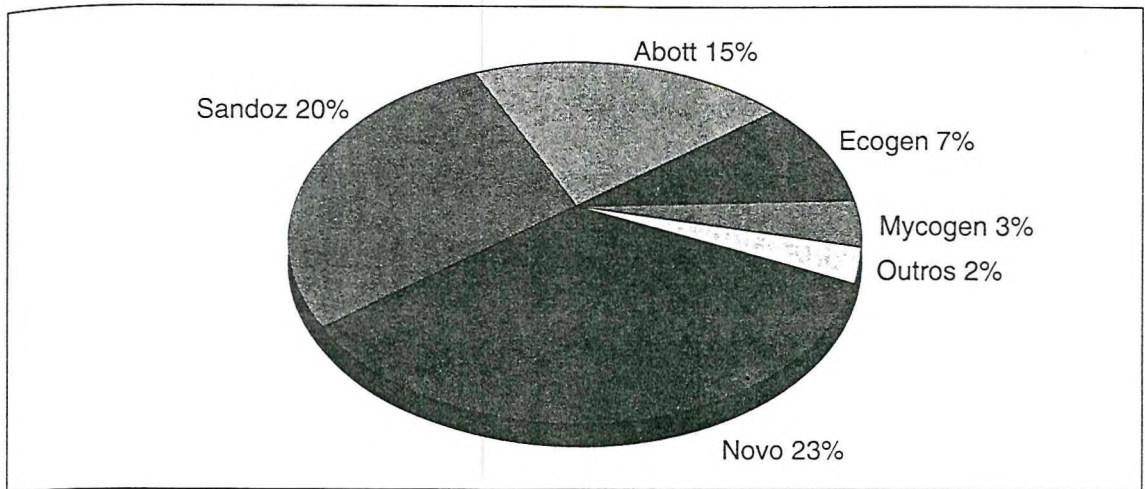


Figura 11.11 – Mercado global de *Bacillus thuringiensis* (em milhões de dolares)

de mercado futuro, onde alguns acreditam que chegue a US\$ 300 milhões até o ano 2000, enquanto outros predizem valores de até US\$ 750 milhões. **Lysansky & Coombs**<sup>(5)</sup> acreditam num crescimento de 10% ao ano, resultando num mercado de US\$ 150 milhões até o ano 2000.

Atualmente os principais participantes no setor de biopesticidas são os principais produtores de Bt, como se pode observar na Fig. 11.12, onde outras grandes companhias como a Ciba e a Cyanamid aparecem na menor faixa do mercado.

Entre as décadas de 1960 e 1970 o mercado de biopesticidas se baseou exclusivamente em Bt para controle de insetos da ordem Lepidoptera. Como o produto parecia ser simples e barato de obter, muitas indústrias viram nesse mercado um lucro fácil. Entretanto, a potência das linhagens determinada em laboratório não reproduziu em condições de campo, onde é necessário um aumento de cerca de 30 vezes nos valores determinados no laboratório para que se observe algum benefício real.



**Figura 11.12** — Divisão do mercado de biopesticidas, por indústrias

Ao redor dos anos 1980 muitas variedades de Bt foram descobertas e determinou-se sua atividade contra Diptera (mosquitos e moscas) e Coleoptera. Além da ampliação do espectro de atuação do Bt investiu-se em abertura de novos mercados, tecnologia de produção, inovação dos produtos (novas formulações) e preços competitivos.

O declínio no uso de pesticidas químicos gerará um número crescente de nichos de mercado para os quais os biopesticidas se mostram apropriados. Os fatores de mercado que favorecem os biopesticidas incluem: preferência crescente do consumidor por produtos sem pesticidas químicos, aumento de mercado para os produtos de cultivo orgânico, desenvolvimento de um sistema agrícola mais sustentável usando programas de manejo integrado, estabilização e harmonização de regulamentação governamental para registro de biopesticidas contendo microrganismos de ocorrência natural ou engenheirados, e presença de muitas companhias de grande porte no mercado de biopesticidas. A Tab. 11.3 fornece uma visão geral da distribuição dos diversos microrganismos entre os produtos comercializados mundialmente<sup>(62)</sup>.

**Tabela 11.3** — Ingredientes ativos em produtos comerciais disponíveis no mercado internacional para controle de pragas agrícolas<sup>(62)</sup>.

Ingrediente ativo	Número de produtos
Bactéria	104
Nematóide	44
Fungo	12
Vírus	8
Protozoário	6
Inseto	107

Dias<sup>(63)</sup> avaliou o mercado de bioinseticidas bacterianos no Brasil como ao redor de 0,5% do mercado potencial. Naquele ano cerca de US\$ 350 milhões foram comercializados em inseticidas, sendo apenas US\$ 2 milhões para os bioinseticidas. Ele aponta como um dos motivos da baixa utilização o alto custo de importação e distribuição, e também a incerteza da disponibilidade do produto quando necessário. Outro fator seria o reduzido número de grupos de pesquisa que atuam nessa área, e o número mais reduzido ainda atuando no setor agrícola.

Para controle de mosquitos e vetores de doenças, entretanto o quadro é mais promissor, pois o envolvimento da saúde pública (controle de dengue, malária, etc.) demanda a substituição dos produtos químicos com urgência. Além disso, as indústrias se associaram aos grupos de pesquisa nos estudos relativos ao Bti e *B. Sphaericus*.

Dias<sup>(63)</sup> salienta também que o mercado brasileiro ainda carece de competitividade, pois todos os produtos são importados. Espera-se que com o lançamento de produtos brasileiros tão efetivos quanto os importados, os custos globais baixem, favorecendo a ampliação do mercado.

Lambert & Pferoen<sup>(64)</sup> lembram que a ausência de normas adequadas à avaliação do produto biológico, em muitos países, reduz ou dificulta o processo de registro, e restringe conseqüentemente o mercado. Essa observação também pode ser aplicada ao Brasil<sup>(58)</sup>.

Deve-se lembrar que a inocuidade absoluta não pode ser garantida em todos os sistemas vivos em todo o tempo. Toxidez ou patogenicidade podem ser geralmente demonstradas se não impuserem restrições à dosagem ou tipo de sistema vertebrado. Uma decisão sobre o campo de uso de um entomopatógeno deve ser baseada em uma prudente consideração dos benefícios a serem obtidos, em contraposição ao potencial de riscos de uso.

## 11.7 – Principais avanços e limitações

Há muito entusiasmo no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a pragas, mas há muitos passos que requerem avaliação cuidadosa e de longo termo entre a produção desta planta (como o algodão contendo Bt) e seu uso extensivo. As propriedades inseticidas dessa planta provavelmente se perderão, a menos que ela seja cultivada próxima de campos onde o inseto “alvo” ainda esteja presente. Isso porque em uma grande população de insetos alguns poucos indivíduos não serão sensíveis à toxina e estes terão a vantagem de sobreviverem. O desencadeamento de resistência poderá ser particularmente rápido para as plantas que produzirem seu próprio agente tóxico, pois exercerão um efeito nos níveis de população muito abaixo daqueles que ocorreriam com os pesticidas convencionais, promovendo assim um desenvolvimento mais rápido da resistência.

Incentivos financeiros, ou mesmo leis, para persuadir agricultores a adotar plantas “refúgio” deverão ser necessários; entretanto, esta não será uma ação barata ou logística e politicamente fácil de implementar<sup>(3)</sup>.

Claramente, muitas dessas soluções, aparentemente elegantes de controle de doenças e plantas, irão requerer trabalhos de longa duração para serem transferidas com sucesso à prática diária no campo. Não há soluções rápidas nem mesmo perenes para os problemas da agricultura; microrganismos e insetos são muito flexíveis geneticamente<sup>(65)</sup>!

O Bt permanece, sendo o foco principal dos estudos e pesquisas sobre pesticidas microbianos. Desde sua descoberta até aproximadamente 1978 pensava-se que sua atividade tóxica se limitava à ordem Lepidoptera, e as variedades conhecidas até a época eram a base dos produtos conhecidos das grandes companhias, como **Abott**, **Sandoz** e **Novo**.

As descobertas mais recentes de linhagens que atuam contra nematóides, ectoparasitos de animais (como ácaros) e endoparasitos (protozoários), bem como as descobertas mais antigas da atividade contra Coleoptera e Diptera, criaram uma gama maior de oportunidades. Novos produtos estão sendo lançados no mercado, contendo linhagens patenteadas nos Estados Unidos, ou apresentando formulações aquosas especiais que permitem o uso em aplicadores terrestres e aéreos convencionais.

O uso da engenharia genética e técnicas não recombinantes tem gerado variedades com maior ou mais ampla atividade, bem como a possibilidade de novas formulações. Produtos já foram lançados contendo a toxina do Bt internamente a *Pseudomonas*, sendo que estas são unidades não-viáveis, não apresentando preocupações do ponto de vista ambiental. A tecnologia da recombinação genética permitiu a inserção do gene responsável pela produção da toxina do Bt em diferentes hospedeiros, tais como *Escherichia coli*, *B. subtilis*, e algas<sup>(66)</sup>. Também já se inseriu o gene da toxina de Bt em *Clavibacter xyli* var. *cynodontis* (bactéria endofítica em milho), que coloniza rapidamente as raízes, folhas e colmo do milho onde permanece durante toda a vida da planta. É possível também, por meio de outro vetor (*Agrobacterium tumefaciens*) inserir-se genes de Bt para que apresente a síntese de  $\delta$ -endotoxina nos tecidos de plantas de algodão, tomate, batata, fumo e outras culturas de interesse econômico, tendo sido conseguido, também, a inserção direta dos genes nas plantas. Além da sua nova ação inseticida, apresenta como vantagem ao ambiente o fato de não sobreviver fora da planta.

Outra bactéria chegando ao mercado internacional é *Streptomyces griseoviridis*, um biofungicida que se apresenta com atividade contra patógenos de semente e de solo. Essa bactéria atua produzindo substâncias antibióticas que inibem o crescimento dos patógenos. Nessa linha já se estuda também *B. pumilus*, *B. mycoides*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Lactobacillus plantarum*. A engenharia genética pode gerar melhorias em outras espécies, que tornarão os produtos ainda mais efetivos.

Alguns poucos casos de efeitos adversos de Bt e *B.sphaericus* sobre o ser humano foram discutidos por **Drobniewski**<sup>(67)</sup>. O número é bem pequeno, tendo sido inclusive considerada a dificuldade de diagnóstico ou falhas no reconhecimento

nos laboratórios onde foram observados. Ele concluiu que não há razão para interromper o uso dos produtos nos países desenvolvidos nem nos que estão em desenvolvimento, do ponto de vista de risco à saúde humana. Entretanto, considera que a introdução de novas variedades ou de misturas de toxinas não podem ser admitidas como seguras, com base nos trabalhos anteriormente desenvolvidos para outras variedades de microrganismos.

As plantas transgênicas contendo o cristal do Bt também possuem limitações. Uma é a dificuldade em produzir nas células o cristal em níveis que rapidamente matem as larvas. Nem todas as espécies de insetos-praga são igualmente sensíveis aos cristais, e muitas vezes o nível de cristais expressados nas plantas não é capaz de matar os insetos resistentes<sup>(64)</sup>. Também há o risco de expor as larvas a doses muito altas de toxina, induzindo assim à resistência ao cristal.

Uma estratégia interessante para retardar o aparecimento de resistência pode ser a combinação de cristais que são tóxicos para o mesmo alvo, porém se ligam a diferentes sítios receptores no trato digestivo das lagartas<sup>(64)</sup>. Múltiplas mutações nos sítios receptores deveriam acontecer para poder ocorrer resistência. Lembremos porém que a combinação de toxinas pode acarretar mais rapidamente a adaptação do que uma única<sup>(68)</sup>.

### 11.7.1 – Principais avanços x processo fermentativo

Em qualquer dos exemplos apontados acima, é indiscutível a importância do processo fermentativo na produção massal dos novos microrganismos, tanto os que contêm ou expressam a toxina do Bt, como aqueles com potencial para o biocontrole, sejam eles obtidos através de manipulação genética ou não. Para todos eles, as variáveis de produção e recuperação apontadas neste capítulo são válidas, e devem ser cuidadosamente avaliadas para obtenção de um produto de qualidade. As possibilidades de aumento do potencial de biocontrole apresentadas por um microrganismo pode ser ampliada, desde que o processo de produção seja criteriosamente otimizado.

## Bibliografia

- (1) FOSTER, S.J. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacterial, p. 255-395. In: GOULD, G.W.; RUSSEL, A.D.; STEWART-TULL, D.E.S.(ed.) **Fundamental and applied aspects of bacterial spores**. Londres, Blackwell Sci. Publ, 1994.138 p.
- (2) LIU, W.M.; BAJPAI, R.; BIHARI, V. High density cultivation of sporeformers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.72, p.310-325, 1994.
- (3) LYSANSKY, S.G.; COOMBS, J. Technical improvements to biopesticides, p. 345-350. **Brighton Crop Protection Conference. Pests and diseases**. Farnham, BCPC. 1992. 1418 p.
- (4) PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudo com patógenos, p.348-373. In: ALVES, S.B.(coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, Manole, 1986. 407 p.

(5) LYSANSKY, S.G.; COOMBS, J. Developments in the market for biopesticides, p.1049-1054. **Brighton Crop Protection Conference. Pests and diseases.** Farnham, BCPC. 1994. 1418 p.

(6) MORAES, I.O. & D.M.F. CAPALBO. Produção de bactérias entomopatogênicas. p. 296-310. In: ALVES, S.B. (coord.) **Controle Microbiano de Insetos.** São Paulo, Manole, 1986. 407 p.

(7) BRYANT, J.E. Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. **Agric. Ecosyst. and Environm.**, v.49, p.31-35, 1994.

(8) DULMAGE, H.T.; AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature, p. 209-237. In: KURSTAK, E.(ed.), **Microbial and viral pesticides.** Nova York, Marcel Dekker Inc., 1982. 720p.

(9) MARTIN, P.A.W. & R.S. TRAVERS. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.2437-2442, 1989.

(10) MEADOWS, M.P.. *Bacillus thuringiensis* in the environment - ecology and risk assessment, p.193-220. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS S.(ed.), **Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide - theory and practice.** Chichester, John Wiley, 1993. 311 p.

(11) DULMAGE, H.T.; RHODES, R.A. Production of pathogens in artificial media, p. 507-540. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (ed.) **Microbial control of insects and mites.** London, Academic Press, 1973. 861 p.

(12) MORAES, I.O. **Ensaio de fermentação submersa para produção de inseticida bacteriano em minifermentador.** Campinas, 1976. 76 p. Tese (doutoramento) - FEA/UNICAMP.

(13) MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, R.O. Multiplicação de agentes de controle biológico, p. 253-272. In: BETTIOL, W. (coord.) **Controle biológico de doenças de plantas.** EMBRAPA, Brasília, 1991. 388 p.

(14) BERNHARD, K.; UTZ, R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses, p. 255-267. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (ed.) **Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide - theory and practice.** Chichester, John Wiley, 1993. 311 p.

(15) DULMAGE, H.T. Development of isolates of *Bacillus thuringiensis* and similar aerobic microbes for use in developing countries, p. 15-42. In: SALAMA, H.S.; MORRIS, O.N.; RACHED, E. (ed.) **The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries.** Cairo, National Research Centre and IDRC, 1993. 339 p.

(16) DULMAGE, H.T. Production of endotoxin by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. **J. Invertebr. Pathol.**, v.16, p.385-389, 1970.

(17) DULMAGE, H.T. Production of delta endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3, in 3 fermentation media. **J. Invertebr. Pathol.**, v.18, p.353-358, 1971.

(18) EJIOFOR, A.O. Status and prospects of biological control of mosquitoes in Nigéria. **Israel J. Entomol.**, V.23, p.83-90, 1989.

(19) PEARSON, D.; WARD, O.P. Bioinsecticidal activity, bacterial cell lysis and proteolytic activity in cultures of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **J. Appl. Bact.**, v.65, p.195-202, 1988.

(20) AVIGNONE-ROSSA, C.A.; YANTORNO, O.C.; ARCAS, J.A.; ERTOLA, R.J. Or-

ganic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. **World J. Microb. Biotechn.**, v.6, p.27-31, 1992.

(21) PRIEST, F.G. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* **J. Appl. Bacteriol.**, v.72, p.357-369, 1992.

(22) YUDINA, T.T.; SALAMAKHA, O.V.; OLEKHNOVICH, E.V.; ROGATYKH, N.P.; EGOROV, N.S. Effect of carbon source on the biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, v.61, p.402-407, 1993.

(23) MORAES, I.O. **Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa**. Campinas, 1973. 60p. Dissertação (mestrado) - FEA/UNICAMP.

(24) MORAES, I.O. **Brasil Patente BRPI 7608688**. Processo de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano. 1976.

(25) MORAES, I.O. **Brasil Patente BRPI 8500663**. Processo de produção de toxina termoestável de *Bacillus thuringiensis*. 1985.

(26) SIKDAR, D.P.; MAJUMDAR, M.K.; MAJUMDAR, S.K. Effects of minerals on the production of the delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.511-514. 1991.

(27) TIANJIAN, X.; TIANLIANG, M.; XINZHU, X.; QIUMEI, D. Study on optimization of dissolved oxygen to raise spore count of *Bacillus thuringiensis*, p. 221 -226. In: SALAMA, H.S.; MORRIS, O.N.; RACHED, E. (ed.) **The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries**. Cairo, National Research Centre and IDRC, 1993. 339 p.

(28) TIANJIAN, X.; TIANLIANG, M.; XINZHU, X.; ZHIWEN, Y. Metabolic characteristics of *Bacillus thuringiensis* during submerged fermentation, p. 213 - 220. In: Salama, H.S.; Morris, O.N.; Rached, E. (ed.) **The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries**. Cairo, National Research Centre and IDRC, 1993. 339 p.

(29) BLOKINA, T.P.; SAKHAROVA, Z.V.; IGNATENKO, Y.N.; RABOTNOVA, I.L.; RANTENSHEIN, Y.A. Variability in *Bacillus thuringiensis* under various growth conditions. **Microbiology**, v.53, p.340-344, 1984.

(30) FREIMAN, Y.B.; CHUPIN, A.A. Aspects of continuous cultivation of spore-forming microbes from the group *Bacillus thuringiensis*. **Biotechn. Bioeng. Symposium**, v.4, p.259-261, 1973. (Adv. Microb. Eng. Part I.)

(31) CAPALBO, D.M.F. **Contribuição ao estudo de fermentação de *Bacillus thuringiensis***. Campinas, 1982. 81p. Dissertação (mestrado) - FEA/UNICAMP.

(32) SACHIDANANDHAM, R.; RAJENDRAN, N.; SIVAMANI, E.; JAYARAMAN, K.; JENNY, K.; LAFORCE, R.; FIECHTER, A. Optimization of process parameters for an economic production of biocide, *Bacillus thuringiensis* active against lepidopteran agricultural pests by the use of continuous culture studies, p. 233 - 252. In: SALAMA, H.S.; MORRIS, O.N.; RACHED, E. (ed) **The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries**. Cairo, National Research Centre and IDRC, 1993. 339 p.

(33) HESSELTINE, C.W. A millenium of fungi, food and fermentation. **Mycology**, v.57, p.149-197, 1965.

(34) CAPALBO, D.M.F. **Desenvolvimento de processo de fermentação semi-sólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner**. Campinas, 1989. 159p. Tese (doutoramento) - FEA/UNICAMP. 2. impressão.



(53) MOUSSA, F. *Les femmes inventeurs existent - je les ai recontrées*. Genebra, IFIA. 1986. 224 p.

(54) MOUSSA, F. *Inventive women from the Philippines and selected developing countries*. Genebra, IFIA. 1995. 128p.

(55) BURGESS, H.D. Standardization of *Bacillus thuringiensis* products: homology of the standard. *Nature*, v.215, p.664-665, 1967.

(56) HEIMPEL, A.M.; ANGUS, T.A. Diseases caused by certain spore forming bacteria, p. 21-73. In: STEINHAUS, E.A.(ed.) *Insect Pathology: an advanced treatise*. 2. vol. Nova York, Academic Press, 1963. 689p.

(57) TOMPKINS, G.; ENGLER, R.; MENDELSON, M.; HUTTON, P. Historical aspects of the quantification of the active ingredient percentage for *Bacillus thuringiensis* products, p. 9-13. In: HICKLE, L.L.; FITCH, W.L.(ed.) *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. ACS Symposium Series 432. Washington, 1990. 148 p.

(58) NARDO, E.A. De; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J. de; OLIVEIRA, M.C.B. (coords). *Requisitos para a análise de risco de produto contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos: uma proposta para os órgãos federais registrantes*. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA, 1995. 42p. (EMBRAPA/CNPMA - Documentos 2)

(59) DULMAGE, H.T.; YOSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A. *Guidelines for production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus*. Genebra, UNDP/WHO-TDR, 1990. 58p.

(60) BURGERJON, A. Au sujet de la caracterization des produits a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner par rapport an un tigrage biologique de la toxine soluble thermostable. *Entomophoga*, v.10, p.55-65, 1965.

(61) DE BARJAC, H.; LECADET, M.M. Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymérase bactérienne. *C.R. Acad. Sc. Paris* v.282, p.2119-2122, 1976.

(62) LYSANSKY, S.G. The market for biopesticides. p.333-334. In: BEADLE, D.J.; BIXHOP D.H.L., COPPING L.G.; DESCON G.K.; HOLLOMON D.W. (ed.) *Opportunities for molecular biology in crop production*. Farnham: BCPC. 1993. (BCPC Monograph 55)

(63) DIAS, J.M.C.S. Os bioinseticidas no Brasil. *Cenargen Informa*, dezembro. 1991, p.9.

(64) LAMBERT, B.; PFEROEN M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis* - facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience*, v.42, p.112-122, 1992.

(65) LEWIS, T. Commitment to long-term agricultural research: a message for science, sponsors and industry. p.3-20. In: *Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases*. Brighton, 1994. Farnham: BCPC, 1994. v. 1

(66) WAALWIJK, C. Engineering *Bacillus thuringiensis* toxins into other bacteria, p. 37-44. In: BEADLE, D.J.; BISHOP, D.H.L.; COPPING, L.G.; DESCON, G.K.; HOLLOMON, D.W.(ed.) *Opportunities for molecular biology in crop production*. Farnham, BCPC, 1993. 334p.

(67) DROBNIEWSKY, F.A. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. *J. Appl. Bacteriol.*, v.76, p.101-109, 1994.

(68) GOULD, F. Simulation model for predicting durability of insect-resistant germ plasm: a deterministic diploidy, two-locus model. *Environm. Entomol.*, v.15, p.1-10, 1986.