

TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* - POTENCIAL INSETICIDA

I. de Oliveira MORAES

Deptº de Engenharia de Alimentos
Fac. de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

D.M. Fontana CAPALBO
EMBRAPA/CNPDA

1. INTRODUÇÃO

No transcurso dos últimos decênios do século passado e na primeira metade deste, surgiu e foi tomando forma, a idéia do controle microbiano de insetos. Neste campo, merecem destaque as toxinas que atuam como inseticida obtidos por fermentação com *Bacillus thuringiensis*, cujo desenvolvimento tem se intensificado notadamente pelo fato de ser isento de resíduos tóxicos, permitindo a aplicação para controle de insetos, tanto em produtos de origem vegetal até a colheita, como em produtos alimentícios armazenados.

O interesse no estudo do *B. thuringiensis* e na sua produção comercial se deve aos seguintes fatores:

- especificidade, potência e eficácia para os insetos visados;
- garantida inocuidade ao homem, vertebrados e insetos benéficos;
- possibilidade de produção econômica em larga escala;
- não tem havido constatação de qualquer forma de resistência em insetos tratados com este inseticida.

O *B. thuringiensis*, bactéria mesófila, aeróbica, apresenta um corpo proteico para-esporal nas células esporuladas, que atua

como potente toxina à *Lepidoptera*. Esse cristal denominado "delta endotoxina" é tóxico à cerca de 150 espécies de *Lepidoptera* que na fase jovem se apresentam como lagartas fitófagas em sua absoluta maioria, prejudicando tremendamente a horticultura, silvicultura e produtos armazenados.

Além de sua conhecida atuação contra *Lepidoptera*, o *B. thuringiensis* produz por fermentação, outras toxinas, dentre as quais se destaca a beta exotoxina, que é ativa especialmente no controle a Dípteros entre os quais se apresentam inúmeras espécies nocivas à humanidade, quer pelos danos que causam à agricultura, quer pelas moléstias que transmitem ao homem e aos animais.

Como exemplo, podemos citar a mosca de frutas que, pelo seu potencial biótico e extraordinária capacidade de invasão, vem ocasionando elevados prejuízos à fruticultura nacional. A mosca doméstica, as moscas califórídeas são de importância médica por serem vetores de doenças através de suas larvas.

Esta toxina termoestável atende também ao propósito de inocuidade aos vertebrados aliado à efetiva ação no controle ao inseto visado.

O desenvolvimento do *B. thuringiensis* como inseticida ficou relegado a um plano inferior, visto que os inseticidas químicos eram produzidos a custos muito mais reduzidos e seu espectro de atuação era muito amplo. Entretanto, o desenvolvimento de resistência do inseto à maioria desses inseticidas químicos, os distúrbios no balanço da população de insetos e o impacto ambiental provocado pelos produtos químicos favoreceu a pesquisa e aplicação em campo do *Bacillus thuringiensis* de 1970 para cá. Atualmente,

se faz uma estimativa de produção mundial ao redor de 2500 toneladas/ano, sendo os Estados Unidos o maior produtor (cerca de 1000 t/ano), seguido da França e Inglaterra. Há uma previsão de aumento de 10 a 20% na produção mundial até 1990 (não incluindo a produção da União Soviética, que é consideravelmente grande).

Confirmando essas perspectivas, observa-se que durante a última década as pesquisas sobre *B. thuringiensis* se expandiram em diferentes campos: metabolismo da bactéria, relação entre esporulação e formação do cristal tóxico, análise química e ativação do cristal proteico, modo de ação do cristal e da exotoxina, melhoramento genético e técnicas de aplicação.

Apesar das elevadas quantidades de esporos e cristais de *B. thuringiensis* que vêm sendo e serão produzidos no exterior, o Brasil se apresenta ainda apenas como importador do produto, avaliando-se que a causa da não produção reside no investimento necessário para equipamentos de fermentação.

Sabe-se que a produção de um inseticida microbiano depende em grande parte do custo com que ele pode ser produzido, e este, por sua vez, depende da eficiência com a qual o microorganismo se desenvolve e produz suas toxinas. Na produção estão envolvidos a escolha de uma linhagem apropriada, as condições de fermentação (temperatura, aeração, etc.), a forma pela qual o produto é recuperado do caldo de fermentação e, finalmente do custo do meio de cultura utilizado.

De uma forma geral, o meio de cultura consiste de fontes de carbono e energia como glicose, fonte de nitrogênio como peptona ou extrato de levedura e sulfato de amônia, e sais minerais.

Além destes, muitos micronutrientes como manganês, cálcio, zinco e ferro têm sido recomendados. A presença de manganês é considerada essencial para crescimento e formação do esporo. O potássio é importante para crescimento celular e formação da endotoxina. O extrato de levedura é fonte de aminoácidos, vitaminas e sais minerais. Do ponto de vista industrial este extrato é oneroso uma vez que o processo de produção de esporos gera, um volume pequeno de produto final (1 a 5% do volume de meio correspondente à mistura bruta de cristal e esporos). Por essa razão, outros componentes são procurados para elaboração do meio de cultura.

A introdução de sub-produtos da agroindústria como meio de cultura vem sendo estudada em muitos países como Egito, Estados Unidos, Argentina e também no Brasil.

No Brasil, na Faculdade de Engenharia de Alimentos, da UNICAMP, iniciou-se a pesquisa em fermentação de *Bacillus thuringiensis* em 1971, tendo se estudado o comportamento da fermentação em meio de cultura citado na literatura, usando glicose como fonte de carbono. Os resultados encontrados propiciaram a defesa de tese de mestrado (Moracs, I.O.), em 1973, tendo-se estudado a produção das endotoxinas ou seja, complexo esporo-cristal proteico, ao qual são suscetíveis 150 espécies de lepidoptera.

A partir de 1973 até 1976 continuou-se estudando a produção das endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (complexo esporo-cristal), porém pesquisando novos meios de cultura e condições operacionais. O meio de cultura economicamente interessante para o Brasil, foi aquele composto de melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho. Em 1976 defendeu-se a tese de Doutora

do (Moraes, I.O.), e foi depositada a patente BR 7608688 para produção das endotoxinas para emprego contra Lepidoptera. O produto foi testado contra *Ascia monuste orseis*.

Iniciaram-se em seguida as pesquisas sobre as condições operacionais e a ampliação de escala para fermentadores de 20 e 200 l e sobre fermentação contínua sendo defendida duas teses de Mestrado (Santana, M.H.A. 1980 e Capalbo, D.M.F. 1982).

Paralelamente foi iniciada a pesquisa sobre a produção de exotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, objeto de tese de Livre Docência (Moraes, I.O.), defendida em 1981.

Em 1985, depositou-se a patente BR 8500663 tendo-se recebido o Prêmio Governador do Estado de São Paulo.

De 1977 a 1979 foi desenvolvido Projeto EMBRAPA/CNPQA/FEA de aplicação das exotoxinas à ração de suínos para controle de insetos.

De 1984 a 1986 desenvolveu-se o Projeto FINEP/FUNCAMP/FEA para pesquisar subprodutos industriais viáveis para composição de meio de cultura.

Encontra-se em andamento o Projeto OEA, de Ensino e Pesquisa em Processos Fermentativos, que inclui a produção de *Bacillus thuringiensis*.

2. CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DAS ENDO/EXO TOXINAS

A produção comercial de microrganismos ou de seus produtos invariavelmente requer a seleção de uma linhagem específica mais bem adaptada ao processo, de forma a crescer sob condições

econômicas de fermentação.

Manutenção das culturas: A forma mais aceita de manutenção é a liofilização, onde os esporos ou as células vegetativas, suspensas em soro estéril são rapidamente congeladas em tubos e secas sob vácuo; os tubos selados, são armazenados. Outras formas: refrigeração, congelamento em nitrogênio líquido, solo seco estéril.

Meio de cultura, por repiques mensais em laboratório: meio nutriente agar, inoculado com alça, mantém 28-30°C por 48h e então guarda sob refrigeração. Mantém-se sem ressecamento, cobrindo (após crescimento) a cultura com glicerina líquida.

Meio de fermentação: As células microbianas requerem água, carbono (para biossíntese e energia), nitrogênio, minerais e fatores de crescimento. As quantidades de cada componente e a forma em que se apresentam dependerão do processo de fermentação utilizado.

O Bt pode utilizar como fontes de carbono, o amido (produz amilase extracelular), melão, farelos de grãos, subprodutos industriais como água de coco, soro de queijo, etc. O nitrogênio pode ser suprido por sais de amônio, aminoácidos, peptídeos, farelos de cereais, água de maceração de milho (obtido na produção de amido), farinhas, extratos de levedura, hidrolisados de caseína e soro de queijo. Os sais inorgânicos, essenciais para a população (como cálcio e magnésio), podem ser acrescentados ao meio ou, no caso de serem utilizados subprodutos, eles já têm quantidade suficiente de minerais presentes em sua composição. A própria água, não destilada, pode ser fonte de minerais.

Na UNICAMP, utiliza-se água de maceração de milho e melão de cana como únicos ingredientes do meio de cultura, com resultados excelentes (10^9 a 10^{10} esporos/ml em 24 horas de fermentação

em laboratório).

Condições de crescimento: Elas são estabelecidas em função do máximo rendimento em esporos/cristal tóxicos e não somente em função do crescimento celular.

O pH inicial da cultura ocorre ao redor do valor 7. Durante o crescimento há uma queda do pH (em razão da formação dos ácidos orgânicos pela degradação dos carboidratos) até um valor ao redor de 5. Para o Bt não se controla o pH do meio visto que essa queda auxilia/induz a formação do esporo + cristal. Quando o pH retorna ao valor 7 e o ultrapassa, a célula já completou seu ciclo e esporulou. Assim, o acompanhamento da fermentação do Bt através do pH é um fator de importância industrial: rapidez e simplicidade.

O suprimento de oxigênio (Bt é aeróbico) é fator importante tanto no rendimento como economicamente (alto volume de oxigênio = altos gastos de energia). A injeção de ar é realizada através de filtros para evitar contaminação e a transferência do O_2 para o meio é auxiliada pela agitação do meio.

Como se deduz, os gastos de energia com injeção e agitação costumam ser elevados. Após estudos realizados na UNICAMP, verificou-se que para as condições do laboratório (meio de cultura e volume de fermentação) 0,8 vvm é suficiente, acompanhado de rotação = 200-300 rpm.

A temperatura é mantida em $30^\circ C \pm 2^\circ C$ visto ser o Bt um microrganismo mesófilo.

Os tempos de duração dessas duas fases são relativos à escala de produção. Em frascos agitados tivemos 15-24 e 24-30 ho

ras, em minifermentador de 1 litro tivemos 5-10 e 15-20 horas en quanto que em fermentador de 200l tivemos 3,5 a 5h e 7,5-10 horas, respectivamente, para crescimento e esporulação.

3. RECUPERAÇÃO

A recuperação do produto se faz geralmente através da separação das endo/exo toxinas através de filtros com auxiliares de filtração ou através de centrífugas apropriadas.

4. PADRONIZAÇÃO

O Instituto Pasteur da França, através do seu "Laboratorie de Luttle Biologique" produz o padrão E₆₁ que é usado para padronização dos produtos, enquanto que os Estados Unidos usam a designação de unidade internacional. O produto comercial DIPEL (da Abbott Laboratories) está padronizado em unidades internacionais.

5. NORMALIZAÇÃO

A normalização do produto é um assunto bastante controvertido, devido a sua natureza. Os inseticidas químicos normalizam-se através de porcentagem, do princípio ativo, mas para os inseticidas é o bioensaio que define a potência tóxica dos mesmos.

Quando do desenvolvimento inicial do produto comercial, a normalização era feita através da contagem de esporos (métodos presuntivos). Apesar de impróprio, ainda é muito usado por muitos pesquisadores. Deve-se usar o método conclusivo que é através

do bioensaio, medindo-se em unidades arbitrárias, porém relacionadas a um padrão internacional com a adequada escolha do inseto-teste. Este inseto-teste pode ser um problema se for inexistente no país, daí vários autores sugerirem o uso de mais que um inseto-teste para validação dos resultados, empregando-se o padrão e o produto obtido para determinação da dose letal média LD_{50} ou concentração letal média LC_{50} . Melhor que cada produtor tenha sua amostra-referência, mantendo-a para controle na rotina industrial.

6. RECOMENDAÇÕES PARA USO DAS TOXINAS

a. das endo-toxinas

O inseticida bacteriano (fração endotóxica) pode ser empregado e é mesmo recomendado (FDA) para pragas de maçã, alcachofra, feijão, brócoli, couve, couve-flor, alho, algodão, alfaca, melão, batata, espinafre, tomate, soja, reflorestamento. Em 1966, houve proibição do uso de inseticidas químicos em fumo, tendo sido recomendado o uso de *B. thuringiensis* pelas autoridades da Agricultura norte-americana, com excelentes resultados contra *Protoparce sexta* e *Heliothis virescens*. Na FEA o produto obtido teve sua toxicidade verificada contra *Phodia interpunctella* e *Ascia monuste orseis*.

Com vantagens da utilização de Bt podemos citar:

1. delta-endotoxina, como também os esporos incorporados aos produtos, não apresentam toxidez aos mamíferos. Não são tóxicos aos predadores e insetos benéficos, não são fitotóxicos. Devido a essas características, os produtos de Bt, são insetos de quaisquer restrição de uso, podendo inclusive ser aplicados imediatamente antes da colheita (esse é um fator muito interessante na proteção das culturas).

2. Até o momento, apenas um artigo foi publicado demonstrando resistência de insetos ao Bt, porém alguns cientistas questionam este artigo.
3. Bt possui um potencial inexplorado. A descoberta ou produção de novas linhagens com maior atividade ou com espectro de atuação diferente são possibilidades distintas (ex: variedade *israelensis*).

As desvantagens dos preparados à base de Bt (endotoxinas):

1. Espectro pequeno de atuação, limitando a *Lepidoptera* (em proteção de plantas). Como em certos casos deseja-se controlar insetos de outras ordens simultaneamente o uso de Bt fica limitado, uma vez que só os químicos teriam tal atividade.
2. A produção de novas linhagens de Bt estão ainda desprezadas pois suas patentes não podem ser depositadas. Isso desencoraja pesquisas por parte das indústrias.
3. O uso de Bt requer maior sofisticação por parte dos agricultores; posto que é necessário conhecer o tempo de aplicação, enquanto os químicos são geralmente aplicados de forma profilática. Apesar da ação da delta-endotoxina ser rápida, os insetos morrem lentamente e os produtores estão acostumados a ver o efeito dos inseticidas químicos imediatamente.
4. O Bt deve ser ingerido pelos insetos-alvo. A atividade de alimentação dos insetos depende das condições do ambiente, bem como temperatura, luz, umidade e qualidade do alimento. Se não houver toxina suficiente incorporada na ração, a larva irá se recuperar das lesões provocadas pela toxina no trato digestivo e recomeça a se alimentar após 2-3 dias.
5. Até o momento, ou altos custos do Bt tem dificultado o trabalho de difusão do produto. Porém com a possibilidade de produção nacional, baseada em subprodutos (baratos) o quadro pode se tornar mais favorável.

Lembrando-se dos aspectos de impacto ambiental e dos aspectos de segurança envolvidos com o uso de Bt, conclui-se que as vantagens superam as desvantagens.

b. das exotoxinas

A beta exotoxina é um nucleotídeo que é produzido durante a fase de desenvolvimento vegetativo do *Bacillus thuringiensis*. É composta de adenina, ribose, glicose e ácido alárico. Foi descoberta em 1959 e teve sua estrutura química publicada da dez anos depois. É um composto muito estável, que pode até ser autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Seu espectro de ação cobre uma ampla faixa de insetos principalmente *Diptera*, moscas e mosquitos, dos quais a *Musca domestica* ou *Aedes aegypti* podem ser usados como inseto teste, por serem altamente suscetíveis. Os sintomas causados pela beta exotoxina, são: mudanças teratológicas, deformação e morte durante a fase de pupa. A toxina interfere com as RNA-polimerase DNA dependentes, bloqueando a formação de RNA.

Quanto a sua toxicidade a vertebrados, existem estudos farmacológicos que garantem que exotoxina encontrada no meio de cultura de *Bt* é absolutamente não tóxica a vertebrados e praticamente não tóxica a peixes.