

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO A CAMPO DE UMA ESTIRPE DE
Bacillus thuringiensis TÓXICA À LEPIDOPTERA
E SEU POSSÍVEL EFEITO ADVERSO SOBRE
ESPÉCIES NÃO-ALVO.**

FELIPE ROSA RAMOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO Nº. 310

BRASÍLIA/DF
ABRIL/2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO A CAMPO DE UMA ESTIRPE DE *Bacillus thuringiensis*
TÓXICA À LEPIDOPTERA E SEU POSSÍVEL EFEITO ADVERSO SOBRE
ESPÉCIES NÃO-ALVO.**

FELIPE ROSA RAMOS

ORIENTADOR: ROSE GOMES MONNERAT

CO-ORIENTADOR: EDUARDO CYRINO DE OLIVEIRA-FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: Nº. 310/2008

BRASÍLIA/DF
ABRIL/2008

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO A CAMPO DE UMA ESTIRPE DE *Bacillus thuringiensis*
TÓXICA À LEPIDOPTERA E SEU POSSÍVEL EFEITO ADVERSO SOBRE
ESPÉCIES NÃO-ALVO.**

FELIPE ROSA RAMOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO VEGETAL.**

APROVADA POR:

**ROSE GOMES MONNERAT, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia)
(ORIENTADORA) CPF: 512.803.711-06
E-mail: rose@cenargen.embrapa.br**

**JEAN KLÉBER DE ABREU MATOS, PhD. (Universidade de Brasília-UnB)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 002.288.181-68
E-mail: kleber@unb.br**

**EDISON SUJII, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 153.599.481-91
E-mail: sujii@cenargen.embrapa.br**

BRASÍLIA/DF, 28 de ABRIL de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Ramos, Felipe Rosa

Avaliação a Campo de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica à Lepidoptera e seu Possível Efeito Adverso sobre Espécies Não-Alvo. / Felipe Rosa Ramos; orientação de Rose Gomes Monnerat. – Brasília, 2008.

87 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. *Plutella xylostella*. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Repolho. 4. Traça das crucíferas. 5. Ecotoxicologia. I. Monnerat, R. II. PhD

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

RAMOS, F. R. **Avaliação a Campo de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica à Lepidoptera e seu Possível Efeito Adverso sobre Espécies Não-Alvo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 87 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Felipe Rosa Ramos

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Avaliação a Campo de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica à Lepidoptera e seu Possível Efeito Adverso sobre Espécies Não-Alvo.

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Felipe Rosa Ramos

CPF: 718.990.141-87

SMPW Q.17 CONJ. 08 CASA 04

CEP: 71.741-708 - Brasília/DF - Brasil

(61) 9965-5683 E-mail: liperamos81@yahoo.com.br

“Algumas poucas pessoas, em alguns poucos lugares, fazendo algumas poucas coisas, podem mudar o mundo.”

Grafite anônimo no Muro de Berlim

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pois são sempre portos seguros em dias de tormenta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Rose Monnerat, minha orientadora, pelas muitas oportunidades a mim oferecidas e por ter contribuído enormemente para o meu crescimento profissional;

Agradeço ao meu co-orientador Eduardo Cyrino pela grande ajuda na realização desse trabalho e pela paciência quase ilimitada;

Ao Dr. Edison Sujii pela análise estatística dos dados e pelo comentários sempre construtivos;

Aos meus colegas de mestrado Viviane e Rafael pela amizade e companheirismo;

Aos meus colegas de campo Lílian, Felipe Wagner e Janison pela grande ajuda nos trabalhos de campo e coleta dos dados;

A Elsa pela formatação da dissertação e pela alegria contagiante;

A todos do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em especial Vinícius, Érica, Paulo, Guilherme;

As estagiárias do Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados, Daphne e Ingrid, pela ajuda nos testes toxicológicos;

Aos estagiários do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília pela ajuda nos testes toxicológicos;

Ao UniCEUB por fornecer os camundongos utilizados nos testes;

A CAPES pelo apoio financeiro durante uma parte da elaboração desse trabalho;

A BTHEK Biotecnologia por fornecer os produtos testados;

A Universidade de Brasília e seus professores pelo conhecimento por mim adquirido.

LISTA DE ABREVIATURAS

CL ₅₀	Concentração que mata 50% da população testada
TDC	Traça-das-crucíferas
AMCs	Agentes Microbiológicos de Controle
UVs	Ultra-violeta
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
cm ²	Centímetros quadrado
°C	Graus Celsius
RNA	Ácido Ribonucléico
ATP	Adenosina tri-fosfato
kDa	Quilodalton
MDa	Megadalton
ICPs	Cristais Protéicos Inseticidas
MIP	Manejo Integrado de Pragas
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
IN	Instruções Normativas
RET	Registro Especial Temporário
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ng	Nanograma
L	Litro
g	Gramma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
kg	Quilograma

Avaliação a Campo de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica a Lepidoptera e seu Possível Efeito Adverso sobre Espécies Não-Alvo.

RESUMO GERAL

A utilização do *Bacillus thuringiensis* na cultura do repolho para o controle da traça-das-crucíferas tem sido uma alternativa comumente utilizada pelos produtores na substituição dos tradicionais inseticidas químicos que ocasionam prejuízos ao meio ambiente e a saúde humana ao contrário dos produtos biológicos que são inócuos tanto para o homem quanto para espécies não-alvo. Ainda assim, a utilização de Bioinseticidas necessita de aprovação e registro por órgãos regulamentadores e um dos pré-requisitos para esse registro são os testes ecotoxicológicos. Visto isso, o objetivo desse trabalho foi verificar e comparar a eficiência da estirpe S1905, um produto comercial à base de *B. thuringiensis* e um inseticida químico à base de deltametrina no controle da traça-das-crucíferas bem como avaliar os efeitos adversos da cepa S 1905 de *Bacillus thuringiensis* sobre peixes da espécie *Danio rerio*, de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e de camundongos da raça C57BL6. Os resultados mostraram que os produtos biológicos apresentaram ampla vantagem em relação ao químico no controle da traça-das-crucíferas e a estirpe S1905 nas concentrações/doses testadas não apresentou toxicidade ou patogenicidade sobre nenhuma das espécies de organismos testadas, demonstrando que essa estirpe além de ser eficiente no controle da traça-das-crucíferas parece ter baixa periculosidade ambiental.

Palavras-chave: *Plutella xylostela*, *Bacillus thuringiensis*, Controle Biológico, Ecotoxicologia.

FIELD EVALUATION OF A TOXIC TO THE LEPIDOPTERA BACILLUS THURINGIENSIS STRAIN AND ITS POSSIBLE ADVERSE EFFECT ON NON-TARGET SPECIES.

GENERAL SUMMARY

The using of the *Bacillus thuringiensis* on the cabbage culture for the control of the diamondback moth has been an alternative commonly used by the producers to substitute the traditional chemical insecticides that cause damages to the environment and to the human health, as opposed to the biological products that are harmless to the humans so as to the non-target species. Still, the using of bio-insecticides needs the approval and registration by regulation means and one of the pre-requisites to this registration are the eco-toxicological tests. Based on this, the objective of this work was to verify and compare the efficiency of strain S1905, from a commercial product made of *B. thuringiensis* and from one chemical insecticide made of deltametrin to control the diamondback moth as well as to evaluate the adverse effects of strain S1905 of *Bacillus thuringiensis* on fishes of the species *Danio rerio*, on snails of the species *Biomphalaria glabrata* and of mice of the race C57BL6. The results showed that the biological products presented a large advantage on the chemical product on the control of the diamondback moth and the strain S1905 on the tested concentrations/doses did not present toxicity nor patogenicity on none of the tested species of organisms, showing that this strain not only is efficient on the control of diamondback moth but seems to have low environmental danger.

Key words: *Plutella xylostela*, *Bacillus thuringiensis*, Biological Control, Eco-toxicology.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	4
INTRODUÇÃO GERAL	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1 Cultura do Repolho.....	6
1.1.1 Dados botânicos.....	7
1.1.2 Economia.....	7
1.1.3 Perdas em campo por pragas	8
1.2 <i>Plutella xylostella</i>.....	10
1.2.1 Biologia.....	10
1.2.2 <i>Plutella xylostella</i> como praga.....	11
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	14
1.3.1 Histórico.....	15
1.3.1.1 Isolamento e Seleção de estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
1.3.1.2 Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
1.3.2 Importância comercial.....	22
1.3.3 Resistência de insetos as toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	25
1.3.4 Transgênicos.....	27
1.4 Toxicologia de defensivos agrícolas.....	28
1.4.1 Defensivos Agrícolas.....	28
1.4.2 Regulamentação para Registro de Agentes Microbiológicos no Brasil.....	31
1.4.3 Protocolos Internacionais	33
1.4.4 Toxicologia de Bt.....	34
1.4.4.1 Espécies alvo	34
1.4.4.2 Espécies não-alvo	34
OBJETIVO GERAL.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO A CAMPO DE UMA ESTIRPE DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> TÓXICA A LEPIDOPTERA.....	56
RESUMO	56
SUMMARY.....	57
INTRODUÇÃO	59
OBJETIVO.....	60
MATERIAL E MÉTODOS	60

RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ADVERSO DE UMA ESTIRPE DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> TÓXICA A LEPIDÓPTERA SOBRE ESPÉCIES NÃO-ALVO.....	72
RESUMO	72
SUMMARY.....	73
INTRODUÇÃO	74
OBJETIVO GERAL.....	77
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	77
MATERIAL E MÉTODOS	77
Toxicidade Aguda para Peixes	77
Toxicidade Aguda para Caramujos	78
Toxicidade/Patogenicidade Oral Aguda para Camundongos	79
Taxa de Eliminação (clearance) de Camundongos.....	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1 - Cultivar de repolho Coração de Boi. Fonte: TIVELLI & PURQUERIO, 2008.....	7
Foto 2 - Planta de repolho verde. Fonte: TIVELLI & PURQUERIO, 2008.....	7
Foto 3 - Planta de repolho roxo. Fonte: TIVELLI & PURQUERIO, 2008	7
Foto 4 e Foto 5 - Adultos de <i>P. xylostella</i> . Foto: Felipe Ramos.....	11
Foto 6 - Camundongos C57/Black 6. Foto: Felipe Ramos.	39
Foto 7 - Adultos de <i>Danio rerio</i> . Foto: Arquivo Lab. de Ecotoxicologia, Embrapa Cerrados.	40
Foto 8 - Adulto, recém eclodido e postura de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Foto: Felipe Ramos.....	42
Foto 9 - Danos de <i>P. xylostella</i> nas folhas de repolho. Foto: Felipe Ramos.....	63
Foto 10. Criação de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados. a) Adultos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , b) Juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Fotos: Felipe Ramos.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação da toxina Cry. a) Depois da ingestão pelo inseto o cristal se solubiliza no suco intestinal, b) Proteases intestinais clivam o extremo C-terminal, c) A toxina ativada (neste caso Cry1Aa) se une ao receptor na membrana celular, d) O rearranjo estrutural permite os grampos de 2 hélices se insiram na membrana, e) A toxina forma poros de natureza ainda desconhecida (DEMAAGD et al., 2001).....	21
Figura 2 - Mecanismo de ação de plantas transgênicas. Fonte: SCQ, 2006 (modificado).....	28
Figura 3. Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos. Fonte: TOMITA, (2002).....	29
Figura 4 - Porcentagens de mortalidade de adultos de <i>Apis mellifera</i> submetidos a diferentes metodologias de aplicação do Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Fonte: BRIGHENTI <i>et al.</i> , (2007).....	36
Figura 5 - Evolução do número médio de furos causados por <i>P. xylostella</i> ao longo tempo de cultivo de repolho no ensaio de campo 1 em Brasília, DF, 2006.....	65
Figura 6 - Evolução do número médio de furos causados por <i>P. xylostella</i> ao longo tempo de cultivo de repolho no ensaio de campo 2 em Brasília, DF, 2006.	65
Figura 7 – Evolução do número médio de furos causados por <i>P. xylostella</i> ao longo tempo de cultivo de repolho no ensaio de telado em Brasília, DF, 2006/2007.....	65
Figura 8. Gráfico da taxa de eliminação de <i>B. thuringiensis</i> de camundongos ao longo de 4 semanas de observação.....	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Inseticidas utilizados por agricultores para controle da TDC e responsáveis pela indicação. Vargem Bonita e Brazlândia. Distrito Federal. 2000. (Fonte: CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002)	12
Tabela 2 - Inseticidas usados em rotação por produtores de brássicas no Distrito Federal. Brazlândia e Vargem Bonita. 2000. (Fonte: CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002)	13
Tabela 3 - Subespécies de <i>B. thuringiensis</i> . armazenadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, as estirpes caracterizadas e as Proteínas (genes) produzidas por cada uma delas.....	20
Tabela 4 - Produtos comerciais à base de <i>B. thuringiensis</i>	23
Tabela 5 - Produtos aplicados em ensaios de campo e telado para o controle de <i>P. xylostella</i> no experimento conduzido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia entre os meses de agosto de 2006 e janeiro de 2007.	62
Tabela 6 - Porcentagem de cabeças de repolho comercializáveis em experimento avaliando a eficiência de bioinseticidas Bt e inseticida químico no controle de <i>Plutella xylostella</i> em Brasília, DF, 2006/7.....	66
Tabela 7 - Qualidade das cabeças de repolho em experimento avaliando a eficiência de bioinseticidas Bt e inseticida químico no controle de <i>P. xylostella</i> em Brasília, DF, 2006/7.....	67
Tabela 8. Toxicidade de isolados de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>P. xylostella</i> . Fonte: MONNERAT, (2007).	81
Tabela 9. Espécies não-alvo expostas a estirpe S1905 e suas doses administradas.....	82
Tabela 10. Comparação de concentrações utilizadas em diferentes espécies alvo e não-alvo da estirpe S 1905.....	82
Tabela 11 - Órgãos analisados após a 4ª semana de coleta.	84

INTRODUÇÃO GERAL

As brássicas ocupavam em outubro de 2000 uma área de 444 ha no DF (EMATER-DF, 2000). Mais de 95% era cultivada em pequenas propriedades, em áreas inferiores a 1 ha. A traça-das-crucíferas (TDC) é a principal praga das culturas e os maiores prejuízos ocorrem nos meses mais quentes e secos do ano (FRANÇA *et al.*, 1985).

A TDC, *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Yponomeutidae), ataca crucíferas cultivadas e selvagens (PATIL & POKHARKAR 1971, Rahn 1983), em particular as espécies pertencentes ao gênero *Brassica* como repolho, couve-flor, brócolis e couve chinesa. Esse lepidóptero é originário provavelmente da região Mediterrânea e atualmente encontra-se disseminado por todos os continentes (MONNERAT 1995). Os danos causados pela praga nas plantas de interesse comercial ocasionam a redução no valor de mercado dos produtos e eventualmente, quando os ataques são muito severos, causam a morte da planta (SRINIVASAN & VEERESH 1986).

Para reduzir os prejuízos, muitos produtores têm optado pelo método que, aparentemente, pode produzir os melhores resultados: aplicações intensivas de inseticidas químicos para controle da TDC (CASTELO BRANCO *et al.*, 2003).

O uso indiscriminado destes produtos contribui para o aumento da poluição ambiental e dos casos de intoxicação. Há ainda a possibilidade de que os produtos para consumo apresentem resíduos acima do tolerado (CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002). Produtos assim são impróprios para consumo e deverão, em futuro próximo, não ser mais aceitos no comércio já que é política do Ministério da Agricultura e Abastecimento a implantação do Certificado Fitossanitário de Origem como um requisito básico para a comercialização de produtos vegetais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).

O uso de inimigos naturais é uma das alternativas para diminuir ou eliminar o uso de inseticidas em lavouras de repolho (CASTELO BRANCO, & MEDEIROS, 2001). Assim como a utilização de *Bacillus thuringiensis* Berliner

(Bt) em programas de controle biológico também é uma alternativa eficaz e não contaminante (DIBYANTORO & SISWOJO 1988). Diversos biopesticidas à base dessa bactéria encontram-se disponíveis no mercado e, dentre eles, o produto comercial Dipel® tem oferecido bons resultados no controle da *P. xylostella* (FRANÇA *et al.* 1985; MONNERAT *et al.*, 2000).

O complexo espora/cristal de *B. thuringiensis* têm sido utilizado como biopesticida a mais de 35 anos e sua utilização, de forma controlada seguindo suas recomendações, é uma alternativa viável para o controle de insetos, diminuindo assim, o problema de controle dos insetos resistentes aos pesticidas químicos. Uma das vantagens na utilização de *Bt* é sua especificidade aos insetos susceptíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY E SCHNEPF, 1986).

De certa forma, os produtos microbiológicos, caracterizados como agrotóxicos e afins, deveriam seguir as mesmas exigências de segurança relacionadas aos produtos químicos, contudo a maior característica que diferenciam os AMCs (Agentes Microbiológicos de Controle) das substâncias químicas é a habilidade dos primeiros, para se multiplicar e causar infecções, num espaço de tempo não necessariamente longo, como por exemplo, a acumulação de uma substância química persistente em tecidos do corpo. A infecção pode ocorrer não somente nos insetos-alvo, daí a necessidade da realização de testes para avaliar, inclusive, a infectividade (OLIVEIRA-FILHO, 2005).

Os testes de segurança e uso desse microorganismo iniciaram-se a partir de 1950, com o desenvolvimento do produto Thuricide®, utilizando voluntários humanos e camundongos, visando detectar variedades patogênicas (FISHER & ROSNER, 1959; STEINHAUS 1959; HEIMPEL 1971), sendo também realizados diversos estudos com ratos, porquinhos-da-índia e suínos.

De modo geral, as diversas variedades dessa bactéria não têm condições de se desenvolver nos animais homeotérmicos, e as variedades não

produtoras de exotoxina são consideradas de baixa periculosidade para seres humanos e outros mamíferos (PEREIRA *et al.*, 1998).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a susceptibilidade de *P. xylostella* a uma estirpe de *B. thuringiensis*, selecionada do Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tóxica a lepidópteros e avaliar o possível efeito adverso dessa estirpe em espécies não-alvo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CULTURA DO REPOLHO

O repolho é uma hortaliça anual da família Brassicaceae. Tem como região de origem a Costa Norte Mediterrânea, Ásia Menor e Costa Ocidental Européia. Em sua forma selvagem, o repolho era utilizado pelos egípcios, sendo que o seu uso generalizou-se com as invasões arianas entre 2000 e 2500 antes de Cristo. Por ser considerado uma fina iguaria pelos gregos e romanos, era cultivado em suas diversas formas. Acredita-se que o repolho tenha sido introduzido na Europa pelos celtas no século IX. Na América, o repolho foi trazido pelos conquistadores europeus por volta do século XV (TIVELLI & PURQUERIO, 2008).

Dentre as brássicas, destaca-se o repolho, uma hortaliça anual, herbácea, cujo embricamento das folhas formam a cabeça que é a parte comestível da planta (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Os repolhos são classificados, comercialmente, segundo a forma e a cor da cabeça, em redondo, chato, pontudo ou coração-de-boi (Foto 1), crespo ou de Milão e em verde (Foto 2) ou roxo (Foto 3) (SILVA *et al.*, 2008).



Foto 1 - Cultivar de repolho Coração de Boi. Fonte: TIVELLI & PURQUERIO, 2008



Foto 2 - Planta de repolho verde. Fonte: TIVELLI & PURQUERIO, 2008



Foto 3 - Planta de repolho roxo. Fonte: TIVELLI & PURQUERIO, 2008

1.1.1 Dados botânicos

O repolho, *Brassica oleracea* var. *capitata*, é uma hortaliça da família Brassicaceae. Pode ser também chamada de *Brassica capitata* (L) H. Lév. sendo este seu sinônimo botânico. É constituída quimicamente por arsênico, gefarnate, minerais (cálcio, fósforo, ferro, sódio, potássio, magnésio, cloro, enxofre), vitaminas A, B1, B2, B5, C. Possui como propriedades medicinais as funções de abstergentes, antibióticos e anti-úlceras (PLANTAMED, 2008).

1.1.2 Economia

As brássicas ocupam o 3º lugar dentre as hortaliças mais consumidas nos países desenvolvidos, sendo a Ucrânia a maior produtora desta espécie de vegetal (GEVERS *et al.* 1998).

Em nosso país, o repolho é o segundo produto hortícola mais consumido (GEVERS *et al.* 1998), sendo seu cultivo tanto de subsistência como em escala comercial (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Segundo informações disponíveis no site da Associação Brasileira de Horticultura (2008), o repolho é produzido, principalmente no Paraná. De janeiro a junho de 2005, foram produzidas 14,8 mil toneladas do produto, 4,3 mil delas, só em Londrina. Santa Catarina entra como o segundo maior produtor, com uma diferença expressiva em relação ao Paraná. A produção no estado catarinense é de 1.021 toneladas, seguida de São Paulo. Estados como Espírito Santo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, também produzem o repolho, mas em quantidades bem menores.

Em levantamento junto a CEASA-DF, realizado por JUNQUEIRA *et al* (2008), com o objetivo de avaliar a origem, volume e preço do repolho comercializado entre os anos de 1995 e 2000, observou-se que o Distrito Federal foi responsável por 77% do repolho comercializado na CEASA-DF. O preço médio do produto sofreu um ligeiro acréscimo ao longo deste período. Observou-se que, durante o ano, os preços foram menores nos meses de junho, julho, agosto e setembro. No entanto, não foram observadas grandes variações nos preços médios mensais, cujo valor foi US\$ 0,31/kg. O preço médio anual sofreu um aumento significativo de 1995 a 2000, aproximadamente 35%. Isto pode ser explicado por um ligeiro aumento da demanda no período.

O repolho é cultivado durante o ano todo, mas o produto se adapta melhor a um clima mais ameno e até frio. Temperaturas extremas, como geadas ou o forte calor, prejudicam as plantas mais sensíveis (ZOONEWS, 2008).

1.1.3 Perdas em campo por pragas

De acordo com informações coletadas pela FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2002), praga é qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais ou produtos vegetais.

Os insetos têm sido uma das maiores causas de danos na produção de alimentos sendo estas perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial. Estima-se que cerca de 67.000 espécies de insetos causem danos às plantações sendo as regiões mais pobres do mundo, as que mais sofrem com a alta incidência de insetos-praga (BOBROWSKI *et al.*, 2003).

Segundo BOIÇA JÚNIOR *et al.* (2005), dentre as inúmeras pragas que incidem sobre crucíferas, podem ser destacadas: pulgões (*Brevycoquina brassicae*), curuquerê (*Ascia monuste*), traça-das-crucíferas (*P. xylostella*), lagarta-rosca (*Agrotis* spp.) e lagarta-mede-palmo (*Trichoplusia ni*). Maranhão *et al.* (1998) consideraram a TDC, *P. xylostella*, como a principal praga da couve, repolho e outras brássicas. Destaca-se pela alta taxa de alimentação na fase larval, causando grandes prejuízos à cultura chegando a atingir até 100% de perda na produção (BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 2005).

A ocorrência de pragas no cultivo do repolho pode ser um fator limitante para essa cultura e o uso de inseticidas tem sido a principal e praticamente única medida de controle empregada no Brasil e os piretróides e fosforados são os grupos mais utilizados (CASTELO-BRANCO & MEDEIROS, 2001). Diversos testes têm sido feitos para se determinar a eficiência de produtos, bem como o intervalo de aplicações. Entretanto, segundo MELO *et al.* (1994) tem se verificado que os inseticidas recomendados tem perdido eficiência, parcial ou total, principalmente onde o cultivo de brássicas é contínuo.

A resistência de populações de *P. xylostella* a inseticidas químicos já foi detectada por diversos autores. Esta resistência pode ter sido induzida por diversos fatores como, por exemplo, o uso contínuo de um mesmo princípio ativo, aplicação de doses abaixo do recomendado para o controle desta praga entre outros (OOI, 1986).

Uma das alternativas encontradas pelos produtores foi a utilização de produtos à base de *B. thuringiensis*, que se mostrou eficiente no controle de *P. xylostella* em diversas ocasiões. No entanto, em algumas áreas na América Latina, o uso intensivo de *B. thuringiensis* teve como resultado a detecção de populações de *P. xylostella* resistentes a essa bactéria (CASTELO-BRANCO,

et al, 2002). Diante deste problema, medidas para reduzir as aplicações de *B. thuringiensis* tiveram de ser implementadas. Trabalhos em campo demonstraram que aplicações de *B. thuringiensis* para o controle de *P. xylostella* são recomendadas apenas após o início da formação de cabeças (20-25 dias após o transplante) e apenas se o nível de controle for atingido (CARBALLO & HRUSKA, 1989).

1.2 *Plutella xylostella*

P. xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) encontra-se distribuída mundialmente, embora originária da região mediterrânea. Desenvolve-se bem em temperaturas mais elevadas, acima de 20°C (FERREIRA, 1983; KIMOTO, 1993).

1.2.1 Biologia

A *P. xylostella* é um microlepidóptero apresentando-se, na forma jovem, como uma pequena lagarta verde clara, que chega a medir até 10 mm de comprimento.

De acordo com BIO CONTROLE (2008), a fêmea de *P. xylostella* deposita seus ovos na página inferior das folhas, isolados ou em grupos de 2 ou 3 ovos. Esses ovos são muito pequenos de coloração esverdeada e arredondados. Após 3 ou 4 dias nascem as lagartas, que penetram no interior da folha passando a alimentar-se do parênquima, durante 2 ou 3 dias. Em seguida abandonam a galeria e passam a alimentar-se da epiderme da página inferior da folha. Podem atacar tanto folhas novas como folhas velhas, paralisando o crescimento da planta. As lagartas atingem o máximo desenvolvimento após 9 ou 10 dias da eclosão, medindo cerca de 8 a 10 mm de comprimento e desenvolvem-se bem em temperaturas acima de 20°C (FERREIRA, 1983; KIMOTO, 1993).

Quando se transformam em pupas as lagartas tecem um pequeno casulo, facilmente reconhecido por ser constituído de pequenas malhas, na face inferior das folhas. Após cerca de 4 dias de pupa o adulto emerge (Foto 4 e 5). Nos machos a margem posterior das asas anteriores é branca e quando

em repouso forma uma mancha alongada característica sobre a face dorsal (BIO CONTROLE, 2008).



Foto 4 e Foto 5 - Adultos de *P. xylostella*. Foto: Felipe Ramos.

1.2.2 *Plutella xylostella* como praga

A maior ocorrência da *P. xylostella* em campos cultivados é observada nos meses de menor precipitação, entre julho a setembro, sendo que o período crítico de ataque da praga, em repolho, ocorre na formação da cabeça, aproximadamente entre quatro e sete semanas após o transplante. O nível de dano crítico da praga é, de acordo com MATSUBARA (1992), de duas larvas/planta ou um a dois furos por planta.

Segundo SILVA *et al.* (1993) citado por CZEPAK *et al.* (2005), essa praga tem preferência pelo repolho, mas pode atacar também a couve-flor e a couve comum. Pode ocorrer em todo o território brasileiro e, dependendo da região e época de plantio como em estações mais quentes e secas (FRANÇA *et al.*, 1985), podendo reduzir consideravelmente o valor comercial da cultura (MELO *et al.* 1994).

Observações esporádicas em campos de produção de brássicas realizadas por CASTELO BRANCO *et al.*, (2001) demonstraram que são empregados diversos inseticidas para o controle de *P. xylostella*, pulverizados até quatro vezes/semana.

Em estudos de campo realizados por CZEPAK *et al.* (2005) para se avaliar a eficiência de inseticidas no controle de *P. xylostella* concluiu-se que os inseticidas teflubenzuron e chlorfenapyr foram mais eficientes que deltamethrina no controle de *P. xylostella* nas doses testadas.

No entanto o uso indiscriminado de inseticidas sem a prévia estimativa dos danos econômicos de *P. xylostella* nos cultivos tem aumentado os custos de produção, eliminado os inimigos naturais, causado aumento da poluição ambiental e casos de intoxicação de seres humanos e selecionado populações da praga com resistência a diversos inseticidas contendo vários grupos de princípios ativos (MICHEREFF *et al.*, 2000; CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002).

Em informações levantadas por VILLAS BÔAS *et al.*, (2004) observou que em geral, utiliza-se grande número de aplicações de produtos químicos por ciclo da cultura, podendo chegar a 15/20, independente da presença da praga no campo.

CASTELO BRANCO & AMARAL (2002), por meio de entrevistas com agricultores de dois Núcleos Rurais do Distrito Federal, onde a produção de brássicas era significativa demonstraram que dos 12 inseticidas utilizados pelos agricultores destas áreas 5 não eram registrados para o controle de *P. xylostella* (Tabela 1). O uso de produtos não registrados para uma cultura é proibido. No entanto, como o Receituário Agrônômico não é exigido no DF, e tampouco há fiscalização do Estado sobre os produtos comercializados, é fácil adquirir no comércio local qualquer agrotóxico.

Tabela 1 - Inseticidas utilizados por agricultores para controle da TDC e responsáveis pela indicação. Vargem Bonita e Brazlândia. Distrito Federal. 2000. (Fonte: CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002)

Inseticida (classe toxicológica)	Ingrediente ativo	Grupo químico	Responsável pela indicação	Produto registrado para brássicas?
Atabron (I)	Chlorfluazuron	Regulador de crescimento	EMATER	Sim
Dipel (IV)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Biológico	EMATER	Sim
Decis (III)	Deltametrina	Piretróide	EMATER, patrão, revenda	Sim
Folidol (II)	Paration metil	Fosforado	Patrão	Sim
Hamidop (II)	Metamidofós	Fosforado	EMATER, Revenda	Sim

Tamaron (II)	Metamidofós	Fosforado	EMATER, Revenda	Sim
Orthene (III)	Acefato	Fosforado	EMATER	Sim
Elsan (I)	Fentoato	Fosforado	EMATER	não
Ripcord (II)	Cipermetrina	Piretróide	EMATER	não
Sumidam (I)	Esfenvalerato	Piretróide	EMATER	não
Thiobel (II)	Cartap	Ditiocarbamato	EMATER, Revenda	não
Vertimec (III)	Abamectina	Biológico	EMATER, Revenda	não

Neste mesmo levantamento de informações realizado por CASTELO BRANCO & AMARAL, (2002), foi observado que a rotação de inseticidas não era totalmente desconhecida (Tabela 2) sendo utilizada em 34% das propriedades. Porém, dois problemas foram encontrados, o primeiro refere-se ao intervalo para a alternância dos inseticidas (três a 14 dias), o qual não deve permitir que os resultados esperados com a rotação sejam alcançados. A máxima eficiência da rotação é obtida quando cada inseticida cobre uma geração completa da praga (MCKENZIE, 1996). Para *P. xylostella* isto equivale a 21 dias. Como as pulverizações são feitas semanalmente, um mesmo princípio ativo deveria ser utilizado durante três semanas (CASTELO BRANCO *et al.*, 1997).

O segundo problema refere-se aos produtos escolhidos. Para a eficiência da rotação faz-se necessário que os inseticidas empregados pertençam a grupos químicos diferentes, a fim de evitar a seleção de populações com o mesmo mecanismo de resistência (ROUSH, 1993) ou seja, populações que possam desenvolver resistência a um princípio ativo ou grupo químico utilizado em sequência.

Tabela 2 - Inseticidas usados em rotação por produtores de brássicas no Distrito Federal. Brazlândia e Vargem Bonita. 2000. (Fonte: CASTELO BRANCO & AMARAL, 2002)

Agricultor número	Inseticidas (nome comercial)	Ingrediente ativo	Grupo químico	Grau de escolaridade
1	Thiobel Dipel Hamidop	Cartap, <i>B. thuringiensis</i> Metamidofós	Ditiocarbamato Biológico Fosforado	Fundamental incompleto
2	Vertimec Atabron	Abamectin chlorfluazuron	Biológico Regulador de crescimento	Fundamental incompleto
3	Hamidop Decis	Metamidofós Deltametrina	Fosforado Piretróide	Fundamental incompleto
4	Sumidan Ripicord	Esfenvalerate Cipermetrina	Piretróide Piretróide	Fundamental completo
5	Hamidop Tamaron	Metamidofós Metamidofós	Fosforado Fosforado	Fundamental incompleto
6	Hamidop Tamaron Orthene	Metamidofós Metamidofós Acefato	Fosforado Fosforado Fosforado	Médio incompleto
7	Tamaron Hamidop Decis	Metamidofós Metamidofós Deltametrina	Fosforado Fosforado Piretróide	Médio completo
8	Elsan Tamaron Hamidop	Fentoato Metamidofós Metamidofós	Fosforado Fosforado Fosforado	Médio completo

O controle químico é considerado como a principal forma de controle da praga (VILLAS BÔAS *et al.*, 1990; FRANÇA *et al.*, 1985). A maioria dos inseticidas sintéticos tem ação semelhante em organismos alvos e não-alvos, representando um perigo para os insetos benéficos, para os animais selvagens e para o homem, (CHEN *et al.* 1996). A busca de novos compostos para uso no manejo integrado de pragas sem problemas com a contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aumento de frequência de insetos resistentes têm despertado o interesse de vários pesquisadores com relação ao uso de substâncias alternativas para o controle de pragas (VENDRAMINE, 1997).

1.3 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, da família *Bacillaceae* as quais apresentam duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição; outra de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em

esporos. Durante a fase de esporulação, o Bt produz proteínas inseticidas (cristais paraesporais) na fase estacionária do seu ciclo de crescimento. Quando o esporo se encontra em um ambiente favorável ao seu crescimento (meio com nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e temperatura em torno de 28°C), pode germinar e iniciar o crescimento vegetativo (MONNERAT & PRAÇA, 2006; SOBERON & BRAVO, 2001).

Essa bactéria é considerada ubíqua por ter sido isolada de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de diferentes substratos como solo, água, folhas, insetos mortos. O *B. thuringiensis* se diferencia de *B. cereus* e de *B. anthracis* por apresentar um corpo paraesporal ou cristal protéico. Pouco se sabe sobre o *habitat* do *B. thuringiensis*, entretanto, seu requerimento nutricional vitamínico e de aminoácidos como o ácido glutâmico sugere que as formas vegetativas só se reproduzem no interior dos insetos hospedeiros (MONNERAT & PRAÇA, 2006; SOBERON & BRAVO, 2001).

O corpo paraesporal do *B. thuringiensis* contém proteínas denominadas delta-endotoxinas que formam atualmente uma família de mais de 340 membros, classificados em 55 grupos. Elas são produzidas sob a forma de protoxinas que, no intestino do inseto, são transformadas em peptídeos tóxicos pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (MONNERAT & PRAÇA, 2006; ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986).

1.3.1 Histórico

O primeiro isolamento de *B. thuringiensis* foi realizado pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwata em 1901. A bactéria era o agente causal da “sotto-disease” que causava a morte do bicho-da-seda, *Bombix mori*. Em 1908, Iwabuchi a denominou como *Bacillus sotto* Ishiwata, que posteriormente foi considerado inválido e o nome mais recente (*Bacillus thuringiensis*) foi mantido (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000).

O *B. thuringiensis* teve sua descrição definitiva em 1911, na Alemanha, quando Ernst Berliner isolou o bacilo da lagarta-da-traça-da-farinha, *Anagasta kuehniella*. Após este fato, ele o nomeou *Bacillus thuringiensis* em homenagem

à província de Thuringia, onde foi encontrado o primeiro inseto infectado (POLANCZYK & ALVES, 2003). Em 1915 Berliner reportou a existência de um cristal juntamente com esporos de *B. thuringiensis*, mas a atividade deste cristal só foi descoberta tempos depois (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, 2008).

A partir de 1920, fazendeiros franceses começaram a utilizar o *B. thuringiensis* como pesticida. Logo, em 1938, a França iniciou a comercialização de formulações à base de esporos de *B. thuringiensis* chamada de Sporeine que na época era utilizada para o controle da lagarta-da-traça-da-farinha (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, 2008).

Muitos produtos contendo *B. thuringiensis* foram comercializados, mas muitos deles apresentavam limitações. Produtos à base de *B. thuringiensis* utilizados na forma de spray eram rapidamente lavados pela chuva e degradados sob radiações UVs. Muitos insetos não eram susceptíveis ao limitado número de estirpes de *B. thuringiensis* conhecidas na época e todas as estirpes conhecidas na época eram tóxicas apenas para larvas de Lepidoptera. Existiam ainda insetos que vivam no interior das plantas e sob o solo onde o *B. thuringiensis* em spray não tinha atividade (UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN DIEGO, 2008).

Antes de 1976, o *B. thuringiensis* era usado exclusivamente no controle de insetos-pragas na agricultura. Mas a descoberta de um isolado patogênico a dípteros chamado *B. thuringiensis israelensis* (*Bti*) iniciou o uso dessa bactéria no controle de vetores de doenças. Desde então, estão sendo realizados inúmeros programas de seleção, visando ao isolamento de raças mosquitocidas (POLANCZYK *et al*, 2003).

1.3.1.1 Isolamento e Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Os métodos para isolamento do *B. thuringiensis* são eficientes e normalmente de fácil execução (SALEH *et al.*, 1969; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985; TRAVERS *et al.*, 1987). O número de células obtidas de *B. thuringiensis* varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias

(UFC) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 UFC cm² (DAMGAARD, 2000).

Inicialmente as amostras de substrato são submetidas a choque térmico (80°C por 12 minutos/ gelo por 5 minutos) e plaqueadas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) adicionado de 100mg/L de penicilina (YOUSTEN, 1991). Após 48 horas as mesmas são visualizadas em microscópio de contraste de fase para observação da presença de células vegetativas, esporos e cristais. Esse procedimento deve ser realizado para confirmar que as estirpes isoladas são *B. thuringiensis*.

Para execução deste trabalho foi utilizada uma estirpe (S1905) já selecionada do Banco de Germoplasma de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com comprovada toxicidade para insetos da ordem Lepidóptera (MONNERAT *et al*, 2007). Essa estirpe foi utilizada como princípio ativo na formulação do produto utilizado nos ensaios de campo deste trabalho.

1.3.1.2 Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

1.3.1.2.1 α -exotoxina

A α -exotoxina conhecida também como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase é uma enzima que possui atividade citolítica ao atuar sobre os fosfolipídios que formam as membranas de diversos tipos celulares (FAUST; BULLA JR., 1982). Essa toxina é encontrada no sobrenadante de culturas e é altamente tóxica para certos insetos quando administrada via oral ou intra-hemocélica, causando degeneração e lise de hemócitos (KRIEG, 1971). O gene correspondente a essa exotoxina já foi clonado e seqüenciado (MONNERAT & PRAÇA, 2006; LECHNER *et al.*, 1989).

1.3.1.2.2 β -exotoxina

A β -exotoxina ou thuringiensina é uma toxina termoestável produzida por certas estirpes de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. Ela é produzida em grande quantidade por estirpes do sorotipo H1 e em menores quantidades por algumas estirpes dos sorotipos H4a4b,

H4a4c, H5, H9, H10, H11, H12 (SEBESTA *et al.*, 1981). A toxina do tipo I é um análogo do ATP e é composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, com massa molecular de 701 daltons (FARKAS *et al.*, 1969). Essa toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase por competição pelo ATP e é altamente tóxicas para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides, bem como para vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (SEBESTA *et al.*, 1981). Assim, a partir de 1970, os produtos comerciais de *B. thuringiensis* à base de linhagens do sorotipo H1 foram substituídos por outros à base de linhagens não produtoras de β -exotoxina (MONNERAT & PRAÇA, 2006; SEBESTA *et al.*, 1981).

A β -exotoxina do tipo II é produzida por estirpes pertencentes ao sorotipo H8a8b (*morrisoni*), é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à toxina do tipo I, principalmente, para coleópteros (LEVINSON *et al.*, 1990). Segundo esses autores, os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxina estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 kda.

1.3.1.2.3 Vip3A

Uma nova classe de proteínas inseticidas, Vip3A, com atividade contra larvas de lepidópteros foi descrita por ESTRUCH *et al.* (1996). Essas proteínas são produzidas e secretadas por algumas estirpes durante a fase vegetativa e de esporulação, têm massa molecular predita de 88,5 kDa, não têm homologia com proteínas conhecidas e apresentam atividade contra insetos pouco sensíveis à maioria das δ -endotoxinas, como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera exigua*. A clonagem e a caracterização de dois genes homólogos, *vip3A(a)* e *vip3A(b)*, de diferentes estirpes foram descritas (ESTRUCH *et al.*, 1996). Essa foi uma descoberta importante, pois não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtida após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também se poderá utilizar o sobrenadante dela (MONNERAT & PRAÇA, 2006).

1.3.1.2.4 δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt)

As proteínas Cry podem ser definidas como: uma inclusão protéica paraesporal de *B. thuringiensis*. que apresenta efeito tóxico a um determinado

organismo alvo (CRICKMORE *et al*, 1998) ou uma seqüência bastante similar de uma proteína Cry conhecida, enquanto as proteínas Cyt são inclusões protéicas paraesporais de Bt que exibem atividade citolítica ou possui uma seqüência similar a uma proteína Cyt conhecida (MONNERAT E BRAVO, 2000). Essas proteínas apresentam peso molecular variando de 14 a 152 kDa. O processo de formulação desse cristal está ligado à esporulação. Os estudos efetuados sobre a esporulação mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio da esporulação e é liberado quando as células são lisadas. As etapas da esporulação e biogênese do cristal seguem os passos listados abaixo:

1º Estágio: A célula para seu crescimento e sua parede celular se modifica;

2º Estágio: O septo de esporulação é formado, e a cromatina é dividida em duas partes. Começa, nesse momento, a aparição de uma estrutura condensada que é o cristal;

3º Estágio: Formação do pré-esporo;

4º Estágio: Crescimento do esporo e formação do cristal;

5º Estágio: Formação do envelope esporal em torno do esporo. O cristal, fora desse envelope, continua seu crescimento;

6º Estágio: Maturação do esporo, o cristal atinge seu tamanho máximo;

7º Estágio: Ruptura da célula e liberação do cristal e do esporo.

A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos (CRICKMORE *et al*, 1998). Existem mais de 340 diferentes genes Cry e as proteínas Cry estão agrupadas em 55 classes (CRICKMORE, 2008)

Entre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras apresentam de quatro a cinco genes diferentes, como é o caso das subespécies *azawai* HD-137 e *israelensis*

IPS-82 (Tabela 3). Essa última apresentou cinco genes codificadores da δ -endotoxina e outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72 Mda (MONNERAT & PRAÇA, 2006).

Tabela 3 - Subespécies de *B. thuringiensis*. armazenadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, as estirpes caracterizadas e as Proteínas (genes) produzidas por cada uma delas.

Subespécies	Estirpes	Genes cry*
<i>aizawai</i>	616, 1257, 1295, 1576	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ad, cry1Ac, cry1Da, cry1Eb, cry1Fa, cry9E, cry30Aa, cry40Aa.</i>
<i>alesti</i>	655, 1268, 1296	<i>cry1Ae, cry1Ah</i>
<i>darmastadiensis</i>	612, 1167, 1184	<i>cry5Aa, cry5Ab</i>
<i>entomocidus</i>	456, 1185, 1266, 1270, 1306, 1456	<i>cry1Aa, cryBa, cry1Ca, cry1Ib, cry30Ba, cry44Aa</i>
<i>finitimus</i>	1267	<i>cry26Aa, cry28Aa</i>
<i>fukuokaensis</i>	608	<i>cry20Aa, cyt2Ba</i>
<i>galleriae</i>	597, 958, 1260, 1298, 1299	<i>cry1Cb, cry7Aa, cry8Da, cry9Aa, cry9Ba, cry9Ec</i>
<i>israelensis</i>	89, 165, 222, 957, 1282, 1283, 1284, 1285, 1287, 1288, 1291, 1292, 1293, 1294, 1289	<i>cry4Aa, cryBa, cry10Aa, cry11Aa, cyt1Aa, cyt1Ca, cyt2Ba</i>
<i>japonensis</i>	711, 725	<i>cry8Ca, cry9Bb, cry9Da</i>
<i>kenyae</i>	109, 599, 617, 1261	<i>cry11Ac, cry1Ea, cry2Aa</i>
<i>kumamotoensis</i>	1457	<i>cry7Ab, cry18Aa, cry8Ba</i>
<i>kurstaki</i>	49, 76, 93, 121, 128, 546, 570, 603, 604, 605, 606, 607, 609, 610, 611, 699, 701, 764, 1172, 1176, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1201, 1202, 1203, 1205, 1209, 1210, 1258, 1264, 1300, 1450, 1905	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab</i>
<i>morrisoni</i>	130, 1265, 1301, 1302	<i>cry1Bc, cry1Fb, cry1Hb, cry1Ka, cry3Aa, cyt1Aa, cyt2Ba</i>
<i>sotto</i>	615, 1175, 1192, 1204, 1256, 1263, 1256, 1263, 1297, 1305	<i>cry1Aa, cry2Aa, cry14Aa, cry24Ba cry30Ca, cry50A</i>
<i>tenebrionis</i>	1122	<i>cry3Aa, cut2Ba</i>
<i>thuringiensis</i>	08, 34, 601, 728, 1259, 1269	<i>cry1Ba, cry1Ia</i>
<i>tolworthi</i>	62, 66, 67, 75, 90, 135, 459, 1303, 1304	<i>cry3Ab, cry9Ca</i>

* Fonte: GENE BANK (2008).

1.3.1.2.5 Modo de ação das δ -endotoxinas

Segundo BOBROWSKI (2003), o *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica,

naturalmente encontrada no solo. À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode manter-se em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos pólos da célula. Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de δ -endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs). Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, por isso inócuas para a maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos.

POLANCZYK *et al.* (2004), descreve o modo de ação de *B. thuringiensis* da seguinte forma (Figura 1): As proteínas tóxicas Cry, codificadas por genes *cry* e responsáveis pela atividade inseticida deste patógeno são sintetizadas durante a fase estacionária do crescimento bacteriano se acumulam na célula-mãe, na forma de inclusão cristalina que pode ser responsável por mais de 25% do peso seco das células.

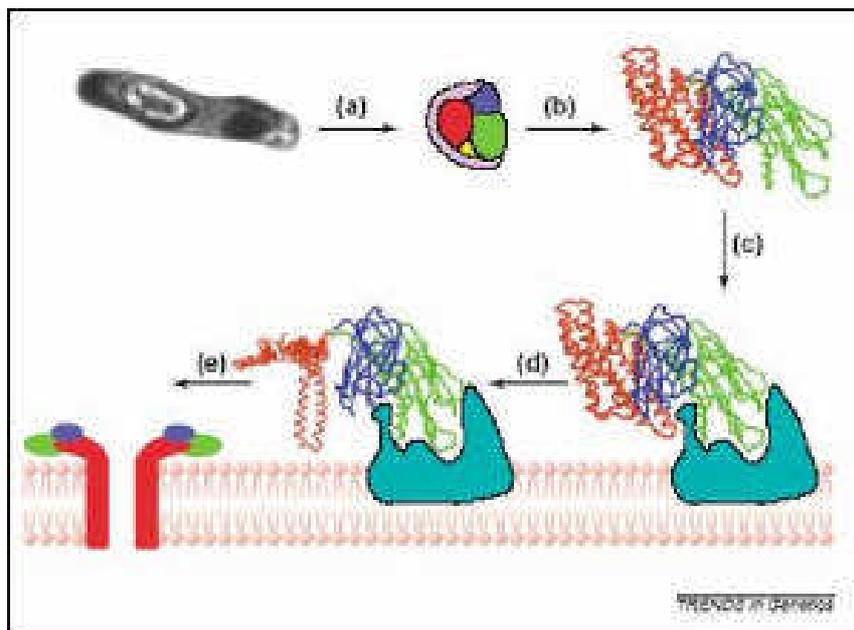


Figura 1 - Mecanismo de ação da toxina Cry. a) Depois da ingestão pelo inseto o cristal se solubiliza no suco intestinal, b) Proteases intestinais clivam o extremo C-terminal, c) A toxina ativada (neste caso Cry1Aa) se une ao receptor na membrana celular, d) O rearranjo estrutural permite os grampos de 2 hélices se insiram na membrana, e) A toxina forma poros de natureza ainda desconhecida (DEMAAGD *et al.*, 2001).

Após a ingestão dos esporos + cristais pelo inseto, os cristais constituídos de protoxinas, são solubilizados pelo pH alcalino, originando as protoxinas que, em presença de enzimas digestivas, são convertidas em 4 ou

mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas). As toxinas hidrolizadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana, o que leva à formação de poros que aumentam a permeabilidade da mesma. O aumento na absorção de água causa divisão celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção o inseto pára de se alimentar.

1.3.2 Importância comercial

Os produtos à base de *B. thuringiensis* constituem de 1% a 2% do mercado global de inseticidas, estimado em 8 bilhões de dólares por ano, representando 100 milhões de dólares em vendas anuais (NESTER *et al.*, 2002). Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* possuem como característica uma boa estabilidade visto que não necessitam de condições especiais de armazenamento. Hoje em dia existem aproximadamente 60 produtos à base de *B. thuringiensis*. Alguns deles são apresentados na tabela 4 (CERÓN, 2004).

A sua produção inicia-se a partir de uma estirpe devidamente caracterizada e que não seja produtora de β -exotoxina (BUITRAGO, 2004). Sua produção é realizada com fermentação semisólida ou fermentação submersa que é o método de seleção onde o processo transcorre entre 27 e 35°C a um pH de 6.8 a 7.2 sob uma regulação de nutrientes, cinética e transferência de oxigênio adequada para uma boa recuperação de biomassa e proteínas inseticidas pra sua posterior formulação e envase (BUITRAGO, 2004). Certas combinações de proteínas Cry mostram sinergia em seus efeitos (CERÓN, 2004). Com manipulação genética podem ser criadas combinações dos genes mais usados com a potencialização dos efeitos desejáveis (SCHNEPF *et al.*, 1998).

Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* se classificam em produtos de primeira geração (esporos e cristais), segunda geração (esporos e toxinas de estirpes com introdução de genes de δ -endotoxina de outra estirpe), terceira

geração (bactérias recombinantes mortas especialmente *Pseudomona fluorescens*) e quarta geração (quimeras de proteínas) (CERÓN, 2004).

Um inseticida biológico com esporos e cristais apresenta vários problemas como seu efeito lento (morte do inseto de 24 a 48 horas após a aplicação do produto), margem estreita de atividade (quando está presente mais de um inseto praga), pouca persistência em campo (devido a radiações solares e temperatura) e não são eficientes para insetos que atacam raízes ou partes internas das plantas (CERÓN, 2004). Estes inconvenientes tem sido solucionados com o uso de produtos de segunda e terceira geração com estirpes que expressam mais de um gene *cry* e com a introdução destes genes em bactérias recombinantes capazes de chegar a tecidos internos como *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* (TURNER *et al.*, 1991), que chega ao tecido vascular do milho, ou *Pseudomonas* e *Agrobacterium* (OBUKOWICZ *et al.*, 1986; WAALWIJK *et al.*, 1991) que crescem na zona de rizosfera.

Tabela 4 - Produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*.

Empresa	NOME COMERCIAL	VARIEDADE	ORDEM	PROTEÍNAS
Abbott Labs.	Dipel, Biobit	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Gnatrol	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
	Novodor Xentari	<i>tenebrionis aizawai</i>	L	3Aa3, 1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1
	Dibeta	N.D.	N.D.	β -exotoxina
American Cyanamid	Acrobe	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Bactec	Bernan Bt	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Bthek Biotecnologia	Bt-horus	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
	Ponto Final	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Biochem Products	Bactmos	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa

Compagnia di Ricerca chim. CRC	Bactis	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
	Bactucide	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 10Aa1, CytAa	4Ba1, 11Aa1,
	Exobac	N.D.	N.D.	β -exotoxina	
Ecogen Inc.	Lepinox (R)	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ac, 1F-1Ac (R)	2A,
	Crymax	ED7826	L	1Ac, 2A, 1C (R)	
	Raven	<i>kurstaki</i>	C	1Ac, 3A, 3Bb (R)	
	Condor	ED7841	L	Transconjugante	
	Cutlass (T) Foil	EG7673 <i>kurstaki</i> (T) <i>kurstaki</i> (T) <i>kurstaki</i> (T)	L L/C	1Ac, 3Aa (T)	
Farbwerke-Hoechst	Biospor	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ab, 2A, 2B	1Ac,
Fermenta ASC Co.	Cutlass	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ab, 2A, 2B	1Ac,
Glavmikrobioprom	Dendrobacillin	<i>dendrolimus</i>	L	N.D.	
	Endobacterin	<i>galleriae</i>	L	1Cb1	
	Eksotoksin Insektin	<i>tolworthi</i>	N.D.	β -exotoxina	
	Toxobacterin	<i>thuringiensis</i> <i>tolworthi</i>	L N.D.	1Ba1 β -exotoxina	
Jewin-Joffe Industry Limeted	Bitayon	N.D.	L		N.D.
Knoll Bioproducts	Larvo-Bt	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
Korea Explosives	Bt	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
Kyowa-Hatto Kogyo Co.	Selectgyn	<i>aizawai</i>	L	1Aa1, 1Ba1, 1Da1	1Ab1, 1Ca1,
Liebec	Sporine	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
Merck	Agritol	N.D.	N.D.	N.D.	
Mycogen	Matth	<i>Pseudomonas sp</i> (EC)	L	EC.	
	MTrak (R)	<i>Pseudomonas sp</i> (EC)	L	3A (EC)	
	MVP (R)	<i>Pseudomonas sp</i> (EC)	C	EC.	
		<i>Pseudomonas sp</i> (EC)			
Phillips Duphar	Bactospeine	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
	Bactimos	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 10Aa1, CytAa	4Ba1, 11Aa1,
Procida	Plantibac	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,

Radonja	Baturad	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
	Nubilacid	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	1Ab1, 2Aa1,
Sandoz Corp.	Javelin	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1,	1Ab1, 2Aa1,
	Thuricide	<i>kurstaki</i>	L	2Ab1	1Ab1,
	Certan	<i>aizawai</i>	L	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1	2Aa1,
	Teknar	<i>israelensis</i>	D	1Aa1, 1Ba1,	1Ab1, 1Ca1,
	Trident	<i>tenebrionis</i>	C	1Da1 4Aa1, 10Aa1, CytAa 3 A	4Ba1, 11Aa1,
Scientific & Technology Developing	Bt 8010, Rijin	N.D.	L	N.D.	
SDS Biotech K.K.	Delfin, Thuricide	N.D.	L	N.D.	
Thermo Trilogy Corporation	Able	<i>kurstaki</i>	L	N.D.	
	Agree	<i>aizawai</i> -GC91	L	Transconjugante	
	Teknar	(T) <i>israelensis</i>	D	4Aa1, 10Aa1,	4Ba1, 11Aa1,
	Thuricide	<i>kurstaki</i>	L	CytAa	
	Javelin, Delfin	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ac1,	1Ab1, 2Aa1,
	CoStar	<i>kurstaki</i> -SAH	L	2Ab1	
	Steward	<i>kurstaki</i> -SA12 <i>kurstaki</i>	L	N.D. N.D.	
Trident	<i>tenebrionis</i>	C	1Aa1, 1Ac1, 2Ab1 3Aa1	1Ab1, 2Aa1,	
Tuticorin Alkali Chemicals and Fertilisers Limited	Spicturin	<i>galleriae</i>	L		1Cb1

L: lepidópteros, **C:** coleóptero, **D:** díptero. Fonte: CERÓN, 2004.

1.3.3 Resistência de insetos as toxinas de *B. thuringiensis*.

Mais de 500 espécies de insetos vem apresentando resistência a um ou mais inseticidas químicos sintéticos (GEORGHIU & LAGUNES-TEJEDA, 1991). Os produtos à base de *B. thuringiensis* foram utilizados durante muitos anos sem que o fator resistência fosse verificado. No passado era esperado que os insetos não desenvolvessem resistência a *B. thuringiensis*, no entanto, *B. thuringiensis* e insetos coevoluiram juntamente. Em meados dos anos 80,

realizando experimentos de seleção em laboratório com insetos adaptados ao laboratório e insetos capturados de populações selvagens, foram encontradas algumas espécies com níveis variados de resistência aos cristais protéicos de *B. thuringiensis* (SCHNEPF *et al.*, 1998).

O primeiro caso de resistência em condições de campo foi verificado em *P. xylostella* que apresentou altos níveis de resistência a inseticidas à base de *B. thuringiensis* (FERRÉ & VAN RIE, 2002; GUJAR & MOHAN, 2002; MOHAN & GUJAR, 2003). O mecanismo de resistência melhor caracterizado é a alteração dos receptores específicos no intestino médio dos insetos (FERRÉ & VAN RIE, 2002). GRIFFITTS *et al.* (2001) estudando genes *bre* (de resistência a *B. thuringiensis*) em *Caenorhabditis elegans*, concluíram que a resistência às toxinas se deve a perda de uma enzima denominada galactosiltransferase, que adiciona carboidratos a lipídios e proteínas; estes carboidratos seriam o sítio de reconhecimento para as toxinas e sua ausência impediria que a toxina se una as células intestinais.

A tolerância a *B. thuringiensis* pode ser induzida se utilizado baixas concentrações da toxina que estimulam a resposta imune que pode ser transmitida as seguintes gerações, sendo a magnitude da resposta imune dependente de vários genes (MAHBUBUR RAHMAN *et al.*, 2004). O *B. thuringiensis* aplicado na forma de spray é relativamente instável o que unido à variabilidade dos resíduos de baixa concentração na planta podem contribuir para a aparição de insetos resistentes. Os inimigos naturais dos insetos praga como predadores e parasitóides podem influenciar no desenvolvimento de resistência a *B. thuringiensis* por preferir os insetos susceptíveis e intoxicados aos resistentes e saudáveis (NESTER *et al.*, 2002). No caso anterior, se esperaria um aumento no desenvolvimento da resistência, em quanto que, inimigos naturais podem ajudar a retardar o desenvolvimento da resistência a *B. thuringiensis* (SCHNEPF *et al.*, 1998, MONNERAT, 1995).

Em espécies de insetos resistentes como *P. xylostella* e *Pectinophora gossypiella* foi observado um desenvolvimento assincrônico nas populações tolerantes (mais rápido em *P. xylostella*). No entanto foi constatado que os machos de *P. gossypiella* se dispersam aproximadamente 400 metros a partir

do ponto de liberação e que este espaço não é suficiente para que haja uma distribuição de machos selvagens entre seu habitat e o cultivo transgênico (CERDA & WRIGHT, 2002). O exposto acima unido a fatores como alta e contínua intensidade de seleção, gerações que não se misturam, populações migratórias que possuem genes de resistência e isolamento reprodutivo poderiam levar a um novo fenômeno de resistência onde, em um habitat de interação inseto-planta, terminaria por gerar um novo inseto-praga específico de cultivos transgênicos (CERDA & WRIGHT, 2002).

Visto que existem diversos passos no processamento de cristais as populações de insetos podem desenvolver vários meios de resistência (SCHNEPF *et al.*, 1998). A seleção que se faz em laboratório pode ser diferente da seleção natural em campo, e que as populações de insetos mantidas em laboratório apresentam um significativo menor nível de diversidade genética que as populações de campo; os mecanismos de resistência podem estar associados a certos custos que em campo podem ser insignificantes (TRISYONO & WHALON, 1997).

1.3.4 Transgênicos

Plantas transgênicas ou plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividade inseticida representam nova alternativa para o controle de insetos, além de serem consistentes com a filosofia do manejo integrado de pragas (MIP). Atualmente, culturas como soja, milho, algodão, batata e fumo, têm sido modificadas geneticamente, para expressar as proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, e são utilizadas em escala comercial em vários países, atingindo a área de cerca de 102 milhões de hectares (JAMES, 2006). As principais vantagens do uso das plantas geneticamente modificadas são: aumento na produção (BETZ *et al.*, 2000); menores níveis de micotoxinas (DOWD, 2000) e redução na aplicação de inseticidas (ROMEIS *et al.*, 2006), principalmente os, de largo espectro, favorecendo a manutenção de inimigos naturais (GOULD, 1998), que auxiliam no controle de pragas e contribuem para retardar a evolução da resistência (MASCARENHAS & LUTTRELL, 1997).

O século XX foi caracterizado por grandes descobertas que tiveram profundo impacto no melhoramento genético de plantas. Há muitos anos, as plantas cultivadas tem sido manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento clássico. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às técnicas da engenharia genética (Figura 2). Entre as estratégias de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, encontram-se: *B. thuringiensis* (Bt), a mais utilizada; além de colesterol oxidase; lectinas; inibidores de α -amilase; inibidores de proteinases; proteínas inseticidas vegetativas; quitinases; peroxidase; entre outras (CAROZZI & KOZIEL, 1997).



Figura 2 - Mecanismo de ação de plantas transgênicas. Fonte: SCQ, 2006 (modificado)

A área mundial com plantas geneticamente modificadas é de 102 milhões de hectares, sendo que, no período entre 1996 e 2006, a área plantada aumentou mais de 60 vezes. Os quatro principais países em termos de área cultivada são Estados Unidos (54% da área total), Argentina (18%), Brasil (11%) e Canadá (6%), sendo as principais culturas a soja, o milho e o algodão (JAMES, 2006).

1.4 TOXICOLOGIA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

1.4.1 Defensivos Agrícolas.

Os defensivos agrícolas possibilitaram o aumento da produtividade agrícola mundial e têm auxiliado no controle de vetores de diversas doenças,

entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Dentre os efeitos nocivos ao ambiente pode-se citar a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais. Além da contaminação do meio ambiente, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar e ocasionar danos à saúde (EDWARDS, 1973). Datam da década de 50 os primeiros relatos sobre resíduos de inseticidas organoclorados no ambiente e nos alimentos, onde observou-se a ocorrência de bioconcentração e bioacumulação na cadeia alimentar, que resultou em altos teores no homem (ALMEIDA, 1974).

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (Figura 3).

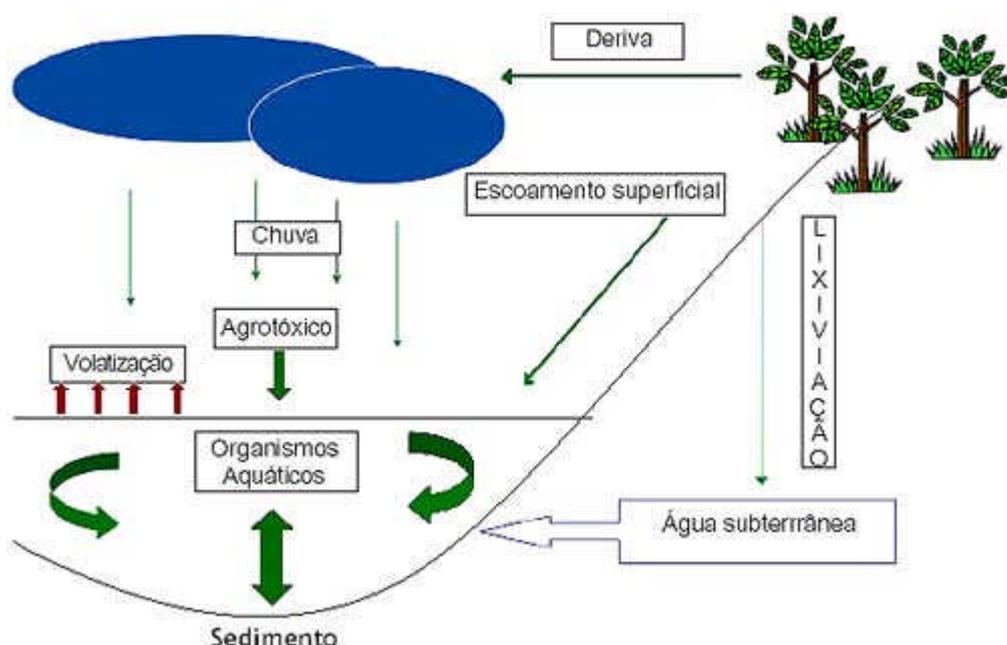


Figura 3. Movimento dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos. Fonte: TOMITA, (2002).

Segundo TOMITA (2002), uma vez na água, dependendo das características físico-químicas o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser metabolizados e transformados ou simplesmente acumulados. Eles podem ser transportados através do sistema aquático por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos. Alguns agrotóxicos e/ou metabólitos podem

também retornar à atmosfera por volatilização. Assim, fica evidenciado que há uma interação contínua dos agrotóxicos entre sedimento e água, influenciada pelo movimento da água, turbulência e temperatura (NIMMO, 1985). Desta interação, pode resultar inclusive maior tempo de exposição dos organismos aquáticos aos compostos tóxicos.

Os agrotóxicos presentes em corpos hídricos podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas portas de entrada e seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e especialmente de suas características físicas e químicas (SPACIE & HAMELINK, 1985). Os peixes e invertebrados podem acumular os agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, pois estes compostos podem se ligar ao material particulado em suspensão e ser ingeridos pelos organismos aquáticos (NIMMO, 1985), dentre outros processos.

Nesse contexto os produtos biológicos tem se mostrado mais seletivos para as espécies consideradas alvo, não apresentando efeitos adversos para espécies de organismos não-alvo ou para seres humanos como demonstrado por FISHERS & ROSNER (1959), MERRITT *et al.* (1989), MITTAL *et al.* (1994), MCCLINTOCK *et al.* (1995), WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999), BOISVERT & BOISVERT (2000).

Uma das principais razões para a expansão do sistema de produção com utilização de produtos biológicos é a maior exigência dos consumidores por produtos isentos de agrotóxicos e que não foram geneticamente modificados e, portanto proporcionam menor impacto ambiental quando comparado ao sistema convencional de utilização de defensivos agrícolas químicos (MORAES *et al.*, 2006).

O primeiro produto comercial a base de *B. thuringiensis*, chamado Sporeine®, estava disponível em 1938 na França (VAN FRANKENHUYZEN, 1993). Nos Estados Unidos (EUA) o primeiro agente microbiológico para controle de pragas (*Bacillus popilliae*) foi registrado em 1948 pelo Departamento de Agricultura daquele país. Somente em 1957 foi produzida a

primeira formulação comercial de *B. thuringiensis*. Atualmente, nos Estados Unidos existem registrados cerca de 84 ingredientes ativos biológicos, compondo em torno de 262 produtos à base de microrganismos (USEPA, 2007).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, os produtos à base de *B. thuringiensis* existentes no mercado são nove: Agree, Bac-Control PM, Bactur PM, Dipel, Dipel PM, Dipel GM, Ecotech Pro, Thuricide e Xentari. Estes produtos comerciais têm como princípio ativo às linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *Aizawai* e são utilizados no controle de lagartas desfolhadoras como *P. xylostella* (traça-das-crucíferas), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) e outras todas pertencentes a ordem Lepidóptera: Noctuidae.

1.4.2 Regulamentação para Registro de Agentes Microbiológicos no Brasil

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, define agrotóxicos como “os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.” Nesse contexto, enquadram-se tanto os agentes de controle biológico (entomopatógenos, parasitóides, predadores e nematóides) como os agentes de controle comportamental (feromônios) utilizados na agricultura com a finalidade de controlar outras espécies consideradas nocivas (OLIVEIRA-FILHO, 2005).

Por serem enquadrados na Lei nº 7.802/89, os produtos biológicos devem seguir o Decreto nº 4.074, de 8 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002) que regulamenta a Lei, além dos instrumentos jurídicos normativos específicos existentes para cada um desses agentes (OLIVEIRA-FILHO, 2007).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 194, de 8 de julho de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), definiu tais produtos como Agentes Microbiológicos de Controle (AMC), e criou normas específicas para a avaliação desse tipo particular de agrotóxico (OLIVEIRA-FILHO, 2005).

Posterior a essa RDC, foram recentemente publicadas Instruções Normativas Conjuntas (INC), trabalhadas e elaboradas pelos órgãos responsáveis pelo registro, cuja finalidade é avaliar os produtos de baixa toxicidade. A INC nº 03/06, de 10 de março de 2006 (BRASIL, 2006), que regula a avaliação de produtos microbiológicos, tem como objetivo no seu aspecto toxicológico, avaliar efeitos adversos do produto técnico e/ou formulado sobre mamíferos, considerando os principais tópicos (MEIRELLES & SANTOS, 2006):

- Patogenicidade do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos;
- Infectividade/persistência do agente microbiológico de controle e de contaminantes microbianos.
- Toxicidade do agente microbiológico de controle, de contaminantes microbianos e de seus subprodutos. Resaltam-se ainda, os seguintes pontos:
 - Definições;
 - Obrigatoriedade do Registro Especial Temporário – RET;
 - Especificações de documentos de acordo com o Decreto 4.074/2002;
 - Identificação do produto;
 - Informações sobre o processo de fabricação;
 - Avaliação toxicológica e da patogenicidade, realizada em três fases, é configurada da seguinte maneira:

Fase I – consiste em uma bateria de testes de curta duração em que o organismo-teste (mamífero) recebe dose máxima única do agente microbiológico de controle, visando obter a máxima chance de o agente de controle causar toxicidade, infectividade e patogenicidade. Se nenhum efeito adverso for observado nessa fase, não há necessidade de se realizar nenhum dos testes de Fase II e Fase III;

Fase II – Regulamentação e Avaliação Toxicológica de Produtos de Baixa Toxicidade foi elaborada para avaliar uma situação particular, quando for observada toxicidade ou infectividade na Fase I, sem evidências de patogenicidade. Se for observada a patogenicidade na Fase I, devem ser realizados os estudos da Fase III.

Nas fases II e III, estudos adicionais para avaliar efeito de toxicidade de preparações do agente microbiológico de controle deverão ser realizados de acordo com protocolos apropriados (MEIRELLES & SANTOS, 2006).

O registro é parte importante para que os bioinseticidas bacterianos possam ser empregados com segurança. A obtenção do registro em órgãos competentes indica que o produto já foi testado quanto à toxicidade, à eficácia e ao impacto ambiental. No Brasil, não são raros os casos de problemas ocasionados por bioinseticidas à base de bactérias, muitas vezes produzidos em condições inadequadas. Existem relatos da ineficácia e do impacto ambiental, como mortalidade de peixes. Tais fatos têm denegrado a imagem dos bioinseticidas bacterianos de maneira geral em órgãos públicos e em comunidades, causando descrença quanto à eficácia desses produtos (SOARES, 2006). Essa condição pode ser explicada pela ausência da avaliação ambiental no registro de produtos utilizados no âmbito da saúde pública.

1.4.3 Protocolos Internacionais

Os protocolos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) pertencem a uma série de protocolos de testes desenvolvidos pelo Escritório de Prevenção, Pesticidas e Substâncias Tóxicas (OPPTS) desta mesma Agência, são utilizados para avaliação de agrotóxicos e

substâncias tóxicas, e para o desenvolvimento de informações ou resultados que serão submetidos à Agência para a apreciação e avaliação da solicitação do registro.

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) é uma organização intergovernamental composta por 30 países industrializados localizados na América do Norte, Europa e Pacífico. A OECD trabalha coordenando e harmonizando políticas governamentais e respondendo por problemas internacionais (OECD, 2004).

O Programa de Pesticidas foi criado em 1992 com a Divisão de Segurança, Saúde e Meio Ambiente da OECD ajudando seus países membros a: adequar seus procedimentos de revisão de pesticidas; compartilhar o trabalho de avaliação de pesticidas e reduzir o risco associado ao uso de pesticidas (OECD, 2004).

A OECD desenvolveu diversos protocolos como os da Série sobre Pesticidas que servem como orientações para a regulamentação de invertebrados como agentes de controle biológico e também do registro de pesticidas biológicos dentro dos países da OECD (OECD, 2004; OECD, 2003).

1.4.4 Toxicologia de Bt

1.4.4.1 Espécies alvo

Como exposto no capítulo anterior o *Bacillus thuringiensis* é extremamente eficiente na função de causar a morte de insetos alvo como as pragas agrícolas e vetores de doenças.

1.4.4.2 Espécies não-alvo

Em testes toxicológicos *B. thuringiensis* se mostrou pouco tóxico quando ingerido por ratos. Pesquisas realizadas por FISHERS & ROSNER (1959), não detectaram efeitos adversos em camundongos inoculados com Thuricide® na concentração de 24.000 miligramas/quilograma (mg/kg) (2×10^{12} UFC/kg). Assim como a inalação de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* por ratos, também se mostrou pouco tóxica não apresentando efeitos adversos na concentração de 5,4 mg/L ($2,6 \times 10^7$ UFC/L) (MCCLINTOCK *et al.*, 1995).

MCCLINTOCK *et al.* (1995), demonstraram ainda que *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* apresentou baixa toxicidade quando em exposição dérmica em ratos tendo sua LD₅₀ > 2000mg/kg ou 4,6 x 10¹⁰ UFC/kg. Em coelhos o efeito de várias subespécies de *B. thuringiensis* se apresentou na forma de leve irritação quando dermicamente expostos e de irritação temporária quando em exposição ocular também em coelhos.

Em estudo de inoculação intraperitoneal realizado por FISHERS & ROSNER (1959), camundongos machos e fêmeas foram injetados com as subespécies de *B. thuringiensis azawai*, *israelensis*, *kurstaki* e *tenebrionis* nas concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ UFC/camundongo. Os trabalhos de laboratório observaram uma mortalidade de 10-100% em camundongos injetados com *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *kurstaki* e *tenebrionis* na maior dose (10⁸ UFC/camundongo). Este mesmo trabalho não detectou toxicidade ou patogenicidade para as menores doses (10⁶ e 10⁷ UFC/camundongo).

BRIGHENTI *et al.*, (2007) testou o produto comercial à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Dipel®, em adultos de *Apis mellifera*. Esse produto quando aplicado com pulverização ou incorporado à pasta Cândi (açúcar de confeitiro e mel) ou à solução aquosa de mel provocou mortalidade de adultos de *A. mellifera* em todas as concentrações utilizadas, com exceção de 0,25 g de Dipel®/100 mL adicionado à solução aquosa de mel a 50%. Ao ser incorporado à pasta Cândi, a CL50 correspondeu a 0,325 g e a CL90 2,127 g do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/60 g de pasta. Adicionado à solução aquosa de mel a 50%, a CL50 foi de 1,403 g e a CL90 foi de 7,759 g do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*/100 mL de solução (Figura 4). Sintomas de infecção pelo *B. thuringiensis* foram identificados nas abelhas adultas e através do isolamento obteve-se uma cultura dessa bactéria o que comprovou a patogenicidade para adultos de *A. mellifera*.

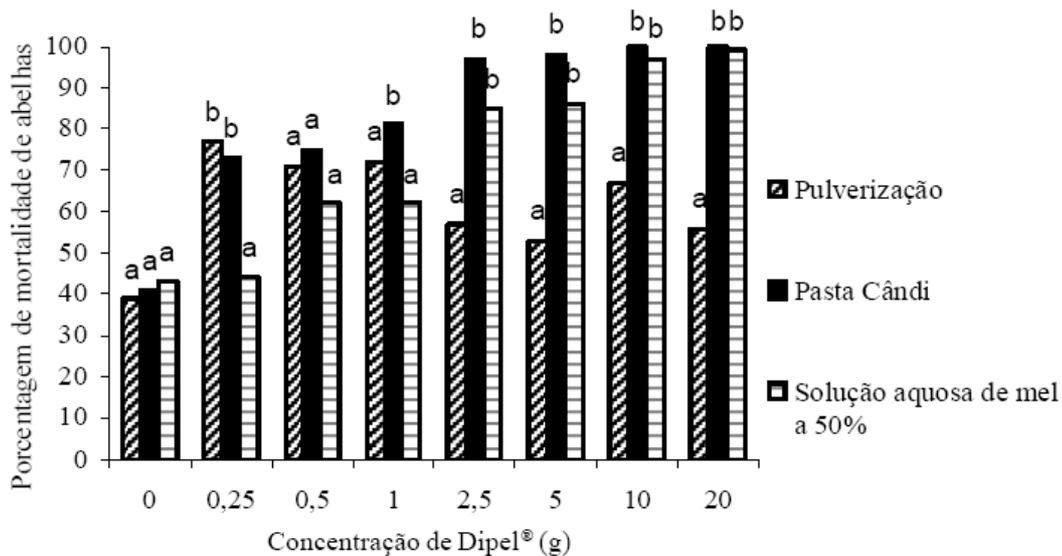


Figura 4 - Porcentagens de mortalidade de adultos de *Apis mellifera* submetidos a diferentes metodologias de aplicação do Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. **Fonte:** BRIGHENTI *et al.*, (2007).

Em testes de toxicidade com seres humanos FISHERS & ROSNER (1959) utilizaram dezoito voluntários onde cada um deles ingeriu, diariamente durante 5 dias, 1 grama de bioinseticida à base de *B. thuringiensis*. contendo aproximadamente 3×10^9 UFC por grama do bioinseticida. Destes voluntários cinco inalaram 100 miligramas do bioinseticidas durante 5 dias. Este estudo não detectou efeito adverso em nenhum dos voluntários.

Para avaliar os possíveis impactos do *B. thuringiensis* sobre invertebrados aquáticos, vários ensaios com diferentes organismos foram realizados, entre estes com *Daphnia magna*, *Cyclops* sp. e *Rivulogammarus pulex* que não foram afetadas pelo bioinseticida, contudo o crustáceo da ordem anostraca *Chirocephalus grubei* apresentou mortalidade de 57% quando exposto à concentração de 18 ppm, o equivalente a 100 vezes a concentração larvicida utilizada para controle de mosquitos (LACEY & MULLA, 1990). Em estudos realizados com moluscos, planárias e anfíbios também não foram observados efeitos adversos após a exposição à concentração de 180 ppm (BOISVERT & BOISVERT, 2000). Em outro estudo, realizado nos Estados Unidos, MERRITT *et al.* (1989) relataram ausência de evidência de efeitos sobre a comunidade de invertebrados aquáticos, após a execução de um programa de controle. Com relação aos efeitos sobre invertebrados do solo, ADDISON (1993) observou que nematóides e besouros podem estar em risco

após a aplicação do Bt. Segundo o autor todas as estirpes de Bt testadas foram tóxicas para ovos do nematóide *Trichostrongylus colubriformis*.

Em estudo com várias espécies de peixe, expostos por 30 dias a concentrações entre 10^9 e 10^{10} unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, não houve evidências de mortalidade, patogenicidade ou infectividade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Num outro trabalho, com *B. thuringiensis kurstaki*, foi observada a mortalidade de 20% das trutas expostas ao final do experimento de 32 dias, sendo essa mortalidade atribuída à excessiva competição por alimento na água, extremamente turva pela presença das altas concentrações do microrganismo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). MITTAL *et al.* (1994) alimentou peixes da espécie *Poecilia reticulata* com larvas contaminadas por vários inseticidas químicos e biológicos. Não foi observada nenhuma mortalidade nos peixes que se alimentaram das larvas contendo Bt. Por outro lado SNARSKI (1990) observou mortalidade de larvas do peixe *Pimephales promelas*, expostos a concentrações da ordem de 10^6 UFC/mL.

A toxicidade aguda e a patogenicidade de diferentes formulações comerciais de *B. thuringiensis* foram avaliadas para várias espécies de aves, entre elas *Colinus virginianus*, uma espécie de codorna, e *Anas platyrhynchos*, uma espécie de pato, por meio da administração via oral, em doses na ordem de 10^9 a 10^{11} UFC/Kg/dia. As espécies testadas não apresentaram efeitos adversos durante todo o período de observação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

INNES & BENDELL (1989) avaliaram, por 90 dias, os efeitos de uma formulação comercial de *B. thuringiensis kurstaki*, sobre populações de pequenos mamíferos silvestres. Os resultados observados sugeriram que a ingestão de insetos contaminados não gerou efeitos adversos nessas populações.

De fato, o maior problema dos inseticidas à base de *B. thuringiensis* tem sido seu efeito contra insetos não-alvo (USEPA, 1998). Segundo POLANCZYK & ALVES (2003) 10 ordens de insetos são suscetíveis, ou seja, podem sofrer algum dano após exposição ao *Bacillus thuringiensis*. Dessas, a ordem

Lepidoptera é a mais atingida com 572 espécies suscetíveis, seguida por Diptera com 266 espécies, Coleoptera 106, Hymenoptera 62, Hemiptera 48, Syphonaptera 7, Orthoptera 6, Isoptera 5, Neuroptera 4 e Thysanoptera 3, totalizando 1079 espécies.

1.4.4.2.1 Camundongos (modelo de mamífero)

Por mais de um século, os camundongos e ratos têm sido as cobaias mais usadas pela ciência. Mas a quantidade desses animais nos laboratórios aumentou assustadoramente nos últimos cinco anos, depois que os cientistas descobriram que, de seus 30 mil genes, apenas 300 não são comuns com os humanos. A semelhança com os humanos faz com que esses pequenos animais sejam perfeitos para estudar, entre outras doenças, a diabetes, o mal de Alzheimer, a distrofia muscular e cânceres de todos os tipos (BIRCH, 2006).

Outra vantagem dos roedores é que eles não têm problemas com a endogamia. Isso significa que gerações de irmãos e irmãs podem se reproduzir e criar animais com praticamente o mesmo DNA dos pais, o que faz com que os resultados dos experimentos possam ser reproduzidos. Além disso, os ratos são pequenos e chegam à fase adulta com rapidez. Do nascimento à morte, em média, são dois anos e meio (BIRCH, 2006).

A linhagem de camundongo C57BL/6, também chamada de "C57 black 6" ou somente "black 6" é uma linhagem geneticamente modificada consangüínea (inbred strain), ou seja, são descendentes de cruzamentos entre irmãos, gerando populações de animais muito homogêneas do ponto de vista genético. Trata-se da linhagem mais amplamente utilizada como modelo teste para doenças humanas, principalmente em virtude de sua uniformidade genética, fácil manutenção, vigor e a origem transgênica, o que torna essa linhagem um bom modelo de animal experimental (FESTING, 1998).



Foto 6 - Camundongos C57/Black 6. Foto: Felipe Ramos.

Os animais utilizados nos experimentos foram cedidos pelo biotério do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1.4.4.2.2 Peixes

A espécie utilizada no presente estudo é *Danio rerio* HAMILTON – BUCHANAN, 1822 (Foto 7), um peixe tropical, ovíparo e onívoro, que atua como consumidor secundário nas cadeias alimentares aquáticas. Este peixe, popularmente conhecido como paulistinha ou peixe-zebra é originário da Índia e do Paquistão e foi introduzido em diversas partes do mundo (ABNT, 2004). Por ser capaz de se adaptar facilmente a diversas condições ambientais naturais e artificiais, o dânio foi utilizado já a partir dos anos 30 para pesquisas científicas (CREASER, 1934), sendo um dos peixes mais estudados mundialmente. Por sua grande capacidade de adaptação e aparência atrativa, é também um peixe ornamental muito popular entre os aquaristas (KNIE & LOPES, 2004).



Foto 7 - Adultos de *Danio rerio*. Foto: Arquivo Lab. de Ecotoxicologia, Embrapa Cerrados.

Esses peixes vivem em média três anos e atingem no máximo 5 cm de comprimento. Apresentam comportamento pacífico e são muito ativos. Na natureza vivem em cardumes, e por isso podem ser mantidos, sem problemas, em número relativamente grande num mesmo aquário.

De acordo com KNIE & LOPES, (2004), uso de *D. rerio* em testes de toxicidade pode ser atribuído principalmente aos seguintes aspectos:

- É uma espécie disponível comercialmente em muitos países;
- É facilmente cultivável em laboratórios;
- Existem à disposição inúmeras bibliografias com informações sobre seu cultivo, reprodução e cuidados em geral;
- Suporta grandes variações de temperatura, de pH e de dureza da água;
- Mostra sensibilidade satisfatória para ampla gama de substâncias químicas;
- É internacionalmente reconhecido como espécie para uso em testes ecotoxicológicos.

Os testes de toxicidade com *D. rerio* podem ser estáticos, sem a renovação da solução-teste, para amostras químicas ou biologicamente estáveis que não sofrem alterações. Para amostras menos estáveis é recomendado o método semi-estático, com substituição da solução-teste em intervalos pré-estabelecidos. Quando a amostra é sabidamente instável, o teste com fluxo contínuo é o mais indicado (KNIE & LOPES, 2004).

1.4.4.2.3 Moluscos (*Biomphalaria glabrata*)

Segundo BARBOSA (1995), os gastrópodes são os moluscos de maior sucesso na evolução adaptativa, sendo encontrados em vários tipos de ambientes devido, principalmente, a multiplicidade de seus hábitos alimentares. Ocorrem como herbívoros, pastadores, detritívoros, filtradores de plâncton e também como carnívoros, parasitas e predadores. A presença de rádula, na massa bucal (átrio), ornada com numerosas fileiras de minúsculos dentes quitinosos, confere aos pulmonados dulcícolas características de animais essencialmente raspadores.

Os caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* são hospedeiros intermediários do trematodo *Schistosoma mansoni*, agente causador da doença tropical humana esquistossomose, doença esta presente em 75 países em desenvolvimento no mundo. De todas as 7 espécies de *Biomphalaria* presentes no Hemisfério Ocidental, *B. glabrata* é a mais importante e a mais utilizada em estudos experimentais. É comumente encontrado na América do Sul e Antilhas onde os caramujos ocupam habitats que podem ser temporários alternando entre inundações e secas. Durante estações chuvosas podem ser dispersados para novos habitats (GSC, 2008).

B. glabrata (Foto 8) é hermafrodita, no entanto, o mecanismo de reprodução preferido por esses organismos é a fertilização cruzada. Possuem a habilidade de se auto-fertilizarem, sendo esta uma excelente estratégia para o sucesso de colonização e re-colonização de habitats. Ambos, ovos e espermatozoides são produzidos em um único organismo, mas os ovos e espermatozoides maduros são expelidos por ductos independentes. Com uma dieta típica de laboratório, um caramujo não-infectado apresenta uma expectativa de vida de

aproximadamente de 9 a 12 meses podendo produzir múltiplas gerações durante um ano (GSC, 2008).



Foto 8 - Adulto, recém eclodido e postura de *Biomphalaria glabrata*. Foto: Felipe Ramos.

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são amplamente estudados no Brasil, porque três de suas espécies são hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, trematódeo parasita causador da esquistossomose mansônica (OLIVEIRA-FILHO *et al*, 2006).

Os testes de toxicidade aquática têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de efeitos deletérios em organismos aquáticos, em virtude, principalmente, do potencial risco da transferência de poluentes do ambiente para os organismos, e avaliação da qualidade da água sobre eles (FERREIRA, 2002).

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da estirpe S 1905 de *Bacillus thuringiensis* no controle de *P. xylostella* e avaliar o possível efeito adverso da estirpe S 1905 sobre camundongos, peixes e caramujos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABH. **Associação Brasileira de Horticultura.** Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?id=1673>, acesso em 07/02/2008.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda-Método de ensaio com peixes.** NBR 15088, mai, 2004.

ADDISON, J. A., **Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review.** *Can. J. Forest Res.*, 23: 1993. 2329–2342.

ALMEIDA, W.F. **Acúmulo de inseticidas no homem e sua significação epidemiológica.** *O Biol.*, São Paulo, v.40,n.6, p.171-183, 1974.

ALVES, S.B. **Controle Microbianos de Insetos.** 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ARONSO, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN,P. ***Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens.** *Microbiological Reviews*, Washington, v. 50, p. 1-24, 1986.

BARBOSA, F.S. **Tópicos em malacologia médica**/Organizado por Frederico Simões Barbosa – Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. 314p.

BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. **Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, p. 156-173, 2000.

BIOCONTROLE. ***Plutela xylostella.*** Disponível em: <http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella_xylostella> acesso em 07/02/2008.

BIRCH, D. **Ratos de laboratório, um bom negócio.** *O Estado de São Paulo*, São Paulo. Domingo, 26 março de 2006. Disponível em <<http://www.estado.com.br/editorias/2006/03/26/ger73148.xml>> Acesso em 02/04/2008.

BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; ZANETTINI, M.H.B. **Genes de *Bacillus thuringiensis*: Uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas.** *Ciência Rural*, Santa Maria, set-out., 2003/vol. 33, nº 005, p. 843-850.

BOIÇA JÚNIOR, A.L. MEDEIROS, C.A.M. TORRES, A.L. CHAGAS FILHO, N.R. **Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve.** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 45-50, jan./mar., 2005.

BOISVERT, M. & BOISVERT, J., **Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments.** *Biocontrol Sci. Technol.* 10. 2000.: 517-561.

BUITRAGO, G. 2004. **La producción de ingredientes activos con *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico.** BRAVO, A. Y CERÓN, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 233-273.

BUTKO, P. 2003. **Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: date and hypotheses.** Appl. Environ. Microbiol. 69:2415-2422.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 03 de 10 de março de 2006. **Estabeleça procedimentos a serem adotados para efeito de registro de agentes microbiológicos.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 mar. 2006. p. 23-25

BRASIL, 2002. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Regulamenta a Lei nº 7.802.** *Diário Oficial da União*, 8 de janeiro de 2002. p. 1-12.

BRIGHENTI, D.M.; CARVALHO, C.F.; CARVALHO, G.A.; BRIGHENTI C.R.G.; CARVALHO S.M **Bioatividade do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para Adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 31, n. 2, p. 279-289, mar./abr., 2007

CARBALLO, V.M. & HRUSKA, A.J. **Períodos Críticos de Protección y efecto de la Infestacion de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidóptera: Plutellidae) sobre el rendimiento del repollo.** Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 14:46-60, 1989.

CAROZZI, N.; KOZIEL, M. **Advances in insect control.** London: Taylor & Francis, 1997. 301p.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L. **Traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. Artrópodes de importância econômica.** CNPH, Brasília, DF. (Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças, 4). 1997.

CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. **Impacto de inseticidas sobre parasitóides de traça- das-crucíferas em repolho, no Distrito Federal.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.36, n.1, p.7-13, 2001.

CASTELO BRANCO, M.& AMARAL, P.S.T. **Inseticidas para controle da traça- das-crucíferas: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal?** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 3, p. 410-415, setembro 2002.

CASTELO-BRANCO, M., VAZQUES, L.L., JARAMILLO, J.E., LONDOÑO, M., FRANÇA, F.H, VILLAS-BÔAS, G.L., JONES, G.D. MEDEIROS M.A., PEREIRA, P., MONNERAT, R.G., CREMA, A., PONTES, L.A. **A review of the Biological Control of *Plutella xylostella* (L.), Diamondback Moth, in South and Central América.** Proceedings of the International Symposium, Montpellier, France, 21-24 October 2002

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, PONTES, L.A., AMARAL, P.S.T. **Avaliação da susceptibilidade a inseticidas em populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 21, n. 3, p. 549-552, julho-setembro 2003.

CERDA, H., D.J. WRIGHT. 2002. **Could resistance to transgenic plants produce a new species of insect pest?** Agriculture, Ecosystems and Environment. 91: 1–3.

CERÓN, J. **Productos comerciales: nativos y recombinantes.** En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 123-147. 2004.

CHEN, C.; CHANG, S.; CHENG, L.; HOU, R.F. **Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep. Yponomeutidae).** J. Appl. Entomol., v.120, p.165-169, 1996.

CREASER, C.W. **The Technic of Handling the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) for the Reproduction of Eggs Which Are Favourable for Embriological Research and Are Avaliable at Any Specified Time Throughout the Year.** Copeia 4, 1934, 159-161.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., FETELSON, J., SCHNEPF, E., VANRIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D.H. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal cristal proteins.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 62, p. 807-813, 1998.

CZEPAK, C. FERNANDES, P.M. SANTANA, H.G. TAKATSUKA, F.S. ROCHA, C.L. **Eficiência de inseticidas para o controle de *Plutela xylostella* (Lepidoptera: Plutelidae) na cultura do repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*).** Comunicação Científica. Pesquisa Agropecuária Tropical, 35 (2): 129-131, 2005.

DAMGAARD, P.H. **Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment.** In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.23-40.

DE MAAGD R.A, BRAVO A, CRICKMORE N. 2001. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** Trends Genet. 17:193–99.

DIBYANTORO, A.L.H. & S. SISWOJO. 1988. **Approach to integrated control of some vegetable insect-pests by using microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* Berl.** Bull. Penelit. Hortic. 16: 67-72.

DOWD, P. F. **Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions:**

utility and limitations. Journal of Economic Entomology, v. 93, n. 6, p. 1669-1679, 2000.

EDWARDS, C.A. **Persistent pesticides in the environment.** 2.ed. U.S.A.: CRC Press, 1973, 170p.

EMATER-DF. **Produção agrícola do Distrito Federal.** Safra 2000. Mês 10/2000. 2000.

EPAGRI. CIRAM, **Centro de Informações de Recursos e de Hidrometeorologia de Santa Catarina Ambientais.** Disponível em: <<http://ciram.epagri.rct-sc.br:8080/cms/zoneamento/culturas/repolho.jsp>> acesso em 07/02/2008

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; GRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. **Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.93, p.5398-5394, 1996

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Glossary of Phytosanitary Terms.** Reference Standard. Secretariat of the International Plant Protection Convention of the Food and Agriculture Organization (FAO) ISPM Publ, n.5, 2002.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLIJS, J.; SORM, F. **The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*.** Collection of Czechoslovak Chemical Communications, v. 34, p. 1118-1120, 1969.

FAUST, R.M.; BULLA JR., A.L. **Bacterial and their toxins as insecticides.** In: KURSTAKI, E. (Ed.). **Microbial and viral pesticides.** New York: Marcel Dekker, 1982. P. 75-206

FERRE, J., AND J. VAN RIE. 2002. **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Annu. Rev. Entomol. 47: 501-533.

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas.** São Paulo: 2002. 109p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Univ. São Paulo].

FERREIRA, F.A. **Efeito do clima sobre brássicas.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 9, n. 98, p. 54-56, 1983.

FESTING, M. F. W., 1998. **Inbred strains of mice and rats.** Disponível em: <http://www.informatics.jax.org/external/festing/search_form.cgi>. Acessado em: 31/03/2008.

FISHERS, R.; ROSNER, L. **Toxicology of the Microbial Insecticide, Thuricide**. Agric. Food Chem. 1959, 7, 686-688.

FRANÇA, F.H.; CORDEIRO, C.M.T.; GIORDANO, L.B.; RESENDE, A.M. **Controle da traça-das-crucíferas em repolho**, 1984. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 3, n. 2, p. 47-53, 1985.

GENEBANK, CRICKMORE, N, Disponível em http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ acesso em 01/04/2008.

GEORGHIOU, G. P., AND A. LAGUNES-TEJEDA. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 1991.

GEVERS, E. ANDRADE, I. HALLIKAINEN, A. HEDLEY, C. HOLM, S. LAMBEIN, F. LAURSEN, P. ROSA, E. ROSNER, H. STRIGL, A. SORENSEN, H. VIDAL-VALVERDE, C. **Nettox compilation of consumption data**. In: GRY, J. JONGEN, W. KOVATSI, A. MOLLER, A. RHODES, M. ROSA, E. ROSNER, H. SPEIJERS, G. SOBORG, I. WALKER, A. (Ed.) **Inhetent food plant toxicants report: nº 4**. Soborg: The Danish Veterinary and Food Administration, 1998. 144p.

GOULD, F. **Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology**. Annual Review of Entomology, v. 43, p. 701-726, 1998.

GUJAR, G.T., MOHAN, M. **Diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis* and its toxins: an Indian experience**. In: KOUL, O., DHALIWAL, G.S., MARWAHA, S.S., ARORA, J.K. (Eds.), **Biopesticides and Pest Management: Progress and Potential**. Campus Books International, New Delhi, India, pp. 96–112. 2002.

GRIFFITTS, J. S., J. L. WHITACRE, D. E. STEVENS, AND R. V. AROIAN. **Bt Toxin Resistance from Loss of a Putative Carbohydrate-Modifying Enzyme**. *Science* 3 August 2001; 293: 2001.860-864

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

GSC, Genome Sequencing Center. ***Biomphalaria glabrata***. Disponível em <<http://genome.wustl.edu/genome.cgi?GENOME=Biomphalaria%20glabrata>> acesso em 03/04/2008.

HEIMPEL, A.M. **Safety of insects pathogens for man and vertebrates**, p 469-489. In: H.D. BURGESS & HUSSEY, N.W. **Microbial control of insects and mites**. New York, Academic Press, 1971. 861 p.

INNES, D. G. L. & BENDELL, J. F., 1989. **The effects on small-mammal populations of aerial applications of *Bacillus thuringiensis*, fenitrothion,**

and **Matacil^(R)** used against jack pine budworm in Ontario. *Can. J. Zool.*, 67: 1318-1323.

JAMES, C. **Global review of commercialized transgenic crops**: ISAAA (Briefs, 36: Preview). Ithaca: ISAAA, 2006. 20p.

JAX MICE, **The Jackson Laboratory**. Disponível em <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> acesso em 03/04/2008.

JUNQUEIRA, A.M.R.; FALCÃO, L.L.; SOUZA, J.F. **Origem, volume e preço do repolho comercializado na CEASA-DF nos últimos seis anos**. Associação Brasileira de Horticultura. Disponível em <http://www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp?id=2412> acesso em 03/04/2008

KIMOTO, T. **Nutrição e adubação de repolho, couve-flor e brócolis**. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E ADUBAÇÃO DE HORTALIÇAS, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Esalq, 1993. P. 149-177.

KNIE, J.L.M. & LOPES, E.W.B. **Testes Toxicológicos. Métodos, Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289p.

KRIEG, A. **Is the potential pathogenicity of bacili for insects related to production of alpha-exotoxin?** *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v. 18, 1971.p 425-426,

LACEY, L. A. & MULLA, M. S., **Safety of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to nontarget organisms in the aquatic environment**, 1990. pp. 169-188. In: LAIRD, M., LACEY, L. & DAVIDSON, E. *Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press, Boca Raton.

LECHNER, M.; KUPKE, T.. STEFANOVIC, S.; GOTZ,F. **Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis***. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.3. 1986.p. 621-626,

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.K.J; CHIU,S.S; CURRIER,S.; GONZÁLEZ JR.J.M. **Identification of b-exotiin production, plasmids encoding b-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography**. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.172, 1990. p. 3172-3179,

MAHBUBUR RAHMAN, M., H.L.S. ROBERTS, M. SARJAN, S. ASGARI AND O. SCHMIDT. **Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 2004. p. 2696-2699.

MARANHÃO, E.A. DE A.; LIMA, M.P.L. DE; MARANHÃO, E.H. DE A.; LYRA FILHO, H.P. **Flutuação populacional da traça-das-crucíferas, em couve, na zona da Mata de Pernambuco**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

OLERICULTURA, 38., 1998, Brasília. Resumos. Hortic. Bras., v.16, n.1, p.50, 1998.

MASCARENHAS, V. J.; LUTTRELL, R. G. **Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae.** Environmental Entomology, v. 26, n. 4, p. 939-945, 1997.

MATSUBARA, W. I. **Controle Químico das pragas de hortaliças.** p. 287-296. In O.A. FERNANDES, A. C. B. CORREIA & S. A. DE BORTOLI. Manejo integrado de pragas e nematóides. Funep, Jaboticabal. 352 p. 1992.

MEDEIROS, P.T. DIAS, J.M.C.S. BARRETO, E.G. SILVEIRA, C.M.S. MONNERAT, R.G. **Susceptibilidade da Traça-das crucíferas a produtos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* na cultura do repolho no Distrito Federal.** Comunicado Técnico. Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, Brasília, N. 109, Dez. 2004.

MEIRELLES, L.C. & SANTOS, M.I.O. **regulamentação e Avaliação Toxicológica de Produtod de Baixa Toxicidade.** IN: OLIVEIRA-FILHO, E.C. & MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

MELO, P. E., M. CASTELO BRANCO & N. R. MADEIRA. **Avaliação de genótipos de repolho para resistência à traça-das-crucíferas.** Horticultura Brasileira, 12(1): 19-24. 1994.

MERRITT, R. W., WALKER, E. D., WILZBACH, M. A., CUMMINS, K.W. & MORGAN, W. T., **A broad evaluation of Bti for black fly (*Diptera: Simuliidae*) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish.** *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 5: 1989. 397-415.

MICHEREFF, M.F. VILELA, E.F. MICHEREFF-FILHO, M. MAFRA-NETO, A. **Uso de feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas.** Pesquisa. Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1919-1926, out. 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 55, de 04 de Dezembro de 2007,** Diário Oficial da União de 06/12/2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit on-line.** Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> acesso em 06 de maio de 2008

MITTAL, P. K., ADAK, T. & SHARMA, V. P., 1994. **Comparative toxicity of certain mosquicidal compounds to larvivorous fish, *Poecilia reticulata*.** *Indian J. Malariol.*, 31: 43-47.

MOHAN, M., GUJAR, G.T. **Local variation in susceptibility of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes.** *Crop Prot.* 22, 495–504. 2003.

MONNERAT, R.G & PRAÇA, L.B. ***Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*.** In: OLIVEIRA-FILHO, E.C. & MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 352 p. 2006.

MONNERAT, R. G., BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência.** In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, 2000. p.163-200.

MONNERAT, R.G. **Interrelation entre la teigne des cruciferes *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Yponomeutidae), son parasitoide *Diadegma* sp. et la bacterie entomophatogene *Bacillus thuringiensis* Berliner.** Montpellier: École Nationale Superieure Agronomique de Montpellier, 1995.160 p. (Tese Doutorado).

MONNERAT, R.G. BORDAT, D. CASTELO BRANCO, M. FRANÇA, F.H. **Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e Inseticidas Químicos Sobre a Traça-das-cruciferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:Yponomeutidae) e Seus Parasitóides.** *An. Soc. Entomol. Brasil* 29(4): 2000. 723-730.

MORAES, S.R.G.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A.; FONTANETTI, A.; CARVALHO, G.J.; MAXIMINIANO, C. **Influência de Leguminosas no Controle de Fitonematóides no Cultivo Orgânico de Alface Americana e de Repolho.** *Fitopatol. Bras.* 31(2), mar - abr 2006

McKENZIE, J.A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance.** Texas: Academic Press. 185 p. 1996.

McCLINTOCK, J.T.; SCHAFFER, C.R.; SJOBLAD, R.D. **A Comparative Review of the Mammalian Tixicity of *Bacillus thuringiensis* – Based Pesticide.** *Pestic. Sci.* 1995 45, 95-105

NESTER, E., THOMASHOW, L.S., METZ, M., GORDON, M. **100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment.** 2002.. Disponível em: <http://www.asmus.org>, acesso em 01/04/2008

NIMMO, D.R. Pesticides. IN: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (ED.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p. 335-373.

OBUKOWICZ, M. G., F.J. PERLACK, K. KUSANO-KRETZMER, E.J. MEYER, AND L.S. WATRUD. 1986. **Integration of the delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing strains of pseudomonads using Tn5.** Gene 45: 327-331.

OECD SERIES ON PESTICIDES. **Guidance for Registration Requirements for Microbial Pesticides.** Number 18. 21-May-2003

OECD SERIES ON PESTICIDES. **Guidance for Information Requirements for Regulation of Invertebrates as Biological Control Agents (IBCA).** Number 21. 16-Jan-2004.

OLIVEIRA-FILHO, E.C., **Segurança de Agentes Microbiológicos para o Controle de Pragas: Avaliação Toxicológica, Regulamentação e Situação Atual.** Revista Brasileira de Toxicologia, 18(1), 71-75, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, E.C., GERALDINO, B.R., GRISOLIA, C.K., PAUMGARTTEN, F.J.R. **Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835).** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75, 1185-1190. 2005.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; GERALDINO, B.R.; GRISOLIA, C.K.; PAUMGARTTEN, F.J.R. **Método Multigeração para avaliação dos Efeitos de Poluentes Sobre a Reprodução de Caramujos de Água Doce.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, n. 2, 2006, 115-118.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. & MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas.** Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil.** Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 2, n. 4, no prelo, 2007.

OOI, P.A.C. 1986. DIAMONDBACK MOTH IN MALAYSIA, P. 25-34. IN TALEKAR, N. S. & T.D. GRIGGS (ED.), **Diamondback Moth Management. Proceedings of the First International Workshop.** Taiwan, 495 p.

PATIL, S.P. & R.N. POKHARKAR. **Diamond-back moth. A serious pest of crucifers.** Res. J. Mahatma Phule Agric. Univ. 26: 1971. 134-139.

PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; REIS, P.R. **Segurança no Emprego de Entomopatógenos.** In: ALVES, S.B. **Controle Microbianos de Insetos.** 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p

POLANCZYK, R.; ALVES, S. ***Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão.** Agrociencia. Vol. VII, Nº 2, Pag. 1-10. 2003.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. **Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti***. Rev Saúde Pública 37(6):813-6. 2003.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, ROGÉRIO F. P.; FIUZA, LIDIA M. **Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMIth) (Lepidoptera: Noctuide)**. R. Bras. Agrociência, v.10, n. 2, p. 209-214, abr-jun, 2004

PLANTAMED. ***Brassica oleracea* var. *capitata***. Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Brassica_oleracea_Capitata.htm> Acesso em 07/02/2008.

RAHN, R. **Les Lépidoptères déprédateurs des cultures de choux dans l'Ouest de la France**. Institut Nationale de Recherche Agronomique. Rennes, 1983.13 p.

ROMEIS, J; MEISSE, M. ; BIGLER, F. **Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control** . Nature Biotechnology, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2006.

ROUSH, R.T. **Occurrence, genetics and management of insecticide resistance**. Parasitology Today, v. 9, p. 174-179, 1993.

SALEH, S. M.; HARRIS, R. F.; ALLEN, O. N. **Method for determining *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in soil**. Canadian Journal of Microbiology, v.15, p.1101-1104, 1969.

SEBESTA, K.; FARKAS,J.; HORSKÁ, K; VANKOVÁ,J., **Thuringiensin, the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis***. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, P. 249-281. 1981.

SILVA A. L., V. R. S.VELOSO, J. C. TARDIVO, C. D. ABREU & R. M. C. E. SILVA. **Avaliação de inseticidas piretróides no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L., 1758) em repolho**. Anais Esc. Agron. Vet., 23(1): 7-12. 1993.

SILVA, E. O.; CARNELOSSI, M.A.G.; PUSCHMANN,R.; SOARES, N.F. F.; VANETTI, M. C. D.; MININ, V. P. R.; CAMPOS R.S.; CARDOSO. R. A. L. **Tecnologia de processamento mínimo de repolho**. Disponível em <<http://www.cnph.embrapa.br/novidade/eventos/semipos/texto12.pdf>> Acesso em 07/02/2008

SNARSKI, V. M., 1990. **Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, under laboratory conditions**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2618-2622.

SOARES, C.M.S., **Produção, Formulação e Aplicação de Bactérias**. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C. & MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a Regulação**

de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas. Planaltina-DF; Embrapa Cerrados, 2006. 352 p.

SOBERON, M. & BRAVO, A. **Generalidades sobre *Bacillus thuringiensis***. In: **Metodologias utilizadas em investigação sobre bactérias entomopatogênicas**. Cidade do México: CYTED, 2001. 1 CD-ROM.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. 1998. ***Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.

SPACIE, A. & HAMELINK, J.L. **Bioaccumulation**. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p.495-525.

SRINIVASAN, K. & G.H. VEERESH. **The development and comparison of visual damage thresholds for the chemical control of *Plutella xylostella* and *Crociodolomia binotalis* on cabbage in India**. Insect Sci. Appl. 7: 1986. 547-557.

STEINHAUS, E.A. **Diseases in a minor chord**. Columbus, Ohio State Univ. Press, 1975. 488p.

TIVELLI S.W. & PURQUERIO L.F.V. **Instituto Agrônomo – IAC, Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura**. Associação Brasileira de Horticultura. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?id=4198> acesso em 09/02/2008.

TOMITA, R.Y. & BEYRUTH, Z., **Toxicologia de Agrotóxicos em Ambiente Aquático**. O Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142, jul./dez., 2002.

TURNER, J.T., J.S. LAMPEL, R.S. STEARMEN, G.W. SUNDIN, P. GUNYUZUL AND J.J. ANDERSON. **Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis***. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1991. 3522-3528.

TRAVERS, R. S., MARTIN, P. A. W.; REICHEFELDER, C. F. **Selective process for efficient isolation soil *Bacillus* sp**. Applied and Environmental Microbiology, v.53, p.1263- 1266, 1987.

TRISYONO, A., AND M. E. WHALON. 1997. **Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Colorado potato beetle** (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 90:267-271.

UCSD, University of California San Diego. ***Bacillus thuringiensis*, History of Bt**. Disponível em: http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html acesso em 22/02/2008.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Biopesticide active ingredients and products containing them.** 2007. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists/bppd_products_by_AI.pdf. Acessado em: 05 mar 2007.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 1998. **R.E.D. Facts, *Bacillus thuringiensis*.** EPA-738-F-98-001, March 1998. 6 p.

VAN FRANKENHUYZEN, K. V.. **The challenge of *Bacillus thuringiensis*.** 1993 p. 1-35. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S.; Bailey, M. J.; Higgs, S. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice.*** John Wiley & Sons, New York.

VENDRAMIN, J.D. **Plantas inseticidas.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. *Resumos.* Salvador: 1997. v.1, n.1, p.10.

VILLAS BOAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A.L. **Controle químico da traça-das-crucíferas em repolho do Distrito Federal.** *Hortic. Bras.*, v.8, n.2, p.10-11, 1990.

VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A.; MONNERAT, R.G.; FRANÇA, F.H. **Inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas e impactos sobre a população natural de parasitóides.** *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.4, p.696-699, out-dez 2004.

YOUSTEN, A.A. ***Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as mosquito larvicide.** *Advanced in Biotechnology Processes* 3, 315-343. 1984.

YOUSTEN, A.A. **Entomopathogenic bacteria for biological control.** In: Workshop Manual. Mimeography Document, Fundação André Tosello, Campinas, Brazil. 50p., 1991.

WAALWIJK, C., A. DULLEMANS, and C. MAAT. **Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*.** *FEMS. Microbiol. Lett.* 77: 257-264. 1991

WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. ***Annual Review of Microbiology***: 40, 549-576.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, ***Bacillus thuringiensis. Environmental Health Criteria***, 217. WHO, Geneve, 105 p. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Informal Consultation on the Development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide.** Geneva, UNDP/World Bank/ Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Não paginado. 1985.

ZOONEWS. **Clima estabiliza preço de repolho.** Disponível em <
<http://www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=58117>> acesso em
08/04/2008.

CAPÍTULO 1 - Avaliação a campo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica a lepidoptera.

Lílian B. Praça¹; Felipe R. Ramos¹; Felipe W. de Oliveira¹; Carlos Marcelo Soares²; Edison Sujii¹; Rose G. Monnerat¹.

¹Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica (PqEB) – S/N^o, Av. W5 norte (final) Caixa Postal 2.372, 70770-900 Brasília – DF; ²Bthek biotecnologia Brasília – DF; lílian@cenargen.embrapa.br

RESUMO

Dois inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, sendo um o produto comercial Dipel e uma estirpe nativa, além de um inseticida químico à base de deltametrina foram avaliados em dois campos e um telado para testar a eficiência dos mesmos no controle de *P. xylostella* na cultura do repolho. O delineamento experimental nos campos foi de blocos ao acaso, com quatro tratamentos e cinco repetições e no telado foi de blocos ao acaso com quatro tratamentos e quatro repetições. Nos campos, cada parcela foi formada por quatro linhas com vinte plantas e, no telado por três linhas com treze plantas. A aplicação dos tratamentos foi realizada em função da contagem dos furos causados pela *P. xylostella* nas quatro folhas centrais do repolho em seis plantas por parcela. O nível de controle foi à média de seis ou mais furos por planta em cada tratamento. Os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos Dipel e a estirpe nativa foram mais eficientes no controle de *P. xylostella* quando comparados com os demais tratamentos em todos os ensaios. No campo 1, os tratamentos Dipel e estirpe nativa foram estatisticamente semelhantes quanto à média das notas de furos por cabeça, mas Dipel produziu mais cabeças comercializáveis. No campo 1, o tratamento controle e o químico não diferiram estatisticamente entre si. No campo 2 e no telado, os tratamentos Dipel e estirpe nativa não apresentaram diferença significativa quanto a porcentagem de cabeças comercializáveis. Os tratamentos controle e inseticida químico do campo 2 e do telado não diferiram entre si e apresentaram resultados significativamente inferiores em relação aos tratamentos Dipel e estirpe nativa assim como ocorreu no campo 1. Esse

trabalho comprovou a eficiência dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* no controle de *P. xylostella* nos dois campos e no telado de repolho durante o período de maior infestação da praga na região do Distrito Federal.

Palavras-chave: controle biológico, bioinseticida, manejo de pragas, resistência

CHAPTER 1 – FIELD EVALUATION OF A *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAIN TOXIC TO LEPIDOPTERA.

Lílian B. Praça¹; Felipe R. Ramos¹; Felipe W. de Oliveira¹; Carlos Marcelo Soares²; Edison Sujii¹; Rose G. Monnerat¹.

¹Embrapa – Genetic Resources and Biotechnology, Parque Estação Biológica (PqEB) – S/Nº, Av. W5 Norte (final) Caixa Postal 2.372, 70770-900 Brasília – DF; ²Bthek Biotecnologia Brasília – DF; lilian@cenargen.embrapa.br

SUMMARY

Two biological insecticides made of *B. thuringiensis* subspecies *kurstaki*, being one of them the commercial product Dipel and a native strain, plus a chemical insecticide made of deltamethrin were evaluated in two fields and one green house to test their efficiency on the control of *P. xylostella* on the cabbage culture. The experimental delineation on the fields was on random blocks, with four treatments and five replications and on the green house was on random blocks, with four treatments and four replications. On the fields, each parcel was formed by four lines with twenty plants and, on the green house by three lines with thirteen plants. The application of the treatments was fulfilled on counting the holes caused by the *P. xylostella* on the four central leaves of the cabbage in six plants per parcel. The control level was the average of six or more holes per plant on each treatment. The obtained results showed that the Dipel treatments and the native strain were more efficient on the control of the *P. xylostella* when compared to the other treatments on all the tests. On the field 1, the Dipel treatments and the native strain were statistically similar to the average of the grades of holes per head, but Dipel produced more commercializable heads. On the field 1, the control treatment and the chemical did not statistically differ from each other. On the field 2 and on the green house, the Dipel treatment and

the native strain did not present a significant difference such as the percentage of commercializable heads. The control treatments and the chemical insecticide of the field 2 and of the green house did not differ from each other and presented significantly inferior performance to the Dipel treatments and the native strain such as happened on the field 1. These results proved the efficiency of the bio-insecticides made of *B. thuringiensis* on the control of *P. xylostela* on the two cabbage fields and the green house during the period of greater infestation of the pest on the Distrito Federal region.

Key words: biological control, bio-insecticide, pest dealing, resistance.

INTRODUÇÃO

Cresce em todo o mundo a preocupação com os impactos da agricultura no meio ambiente. O controle de pragas agrícolas através de inseticidas químicos, muitas vezes utilizados de forma inadequada, pode resultar em conseqüências graves ao homem e ao meio ambiente, além de causar o aparecimento de populações de insetos resistentes. Isto indica a necessidade de se reduzir o consumo destes produtos através do emprego de alternativas de controle mais seguras. Com isso os agentes de controle biológico, principalmente as bactérias, aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para o controle de insetos-praga como *P. xylostella*.

P. xylostella Linnaeus (1758) (Lepidoptera: Plutellidae), conhecida popularmente, como traça-das-crucíferas, é uma praga causadora de elevados prejuízos em brássicas, e de modo particular em repolho (CASTELO BRANCO et al., 1996; FRANÇA & MEDEIROS, 1998) tanto no Brasil quanto em outros países produtores (GODIN & BOIVIN, 1998), podendo ocasionar reduções de até 60% na produção (BIOCONTROLE, 2007).

A traça-das-crucíferas é um microlepidóptero, que se apresenta em sua forma jovem como uma pequena lagarta verde, chegando a medir até 10 mm de comprimento. Após eclosão dos ovos, as lagartas, a partir do segundo estágio, perfuram as folhas das cabeças de repolho, podendo causar danos irreversíveis, prejudicando sua comercialização, por se tornarem imprestáveis ao consumo (SILVA et al., 1993). Empupam muitas vezes dentro das cabeças de repolho e quando emergem os adultos, esses voltam a colonizar as plantas no campo.

Na Região Central do Brasil, o ataque de *P. xylostella* no campo ocorre durante todo o ano, mas sua maior ocorrência acontece de julho a setembro, sendo que seu período crítico de ataque em repolho ocorre na formação da cabeça, aproximadamente entre quatro a sete semanas após o transplante (CASTELO BRANCO et al., 2003).

A principal forma de controle no Brasil tem sido através da utilização intensa de inseticidas químicos, havendo relatos de até 16 aplicações por

cultivo (CASTELO BRANCO & GATEHOUSE, 1997). No entanto, esta prática tem levado ao aparecimento de populações de insetos resistentes, principalmente onde o cultivo de brássicas é contínuo.

Como alternativa ao controle químico, métodos biológicos têm sido estudados e desenvolvidos, cabendo mencionar o uso de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. Esta bactéria produz uma ou várias proteínas tóxicas para a traça-das-crucíferas (MONNERAT *et al*, 1999), tendo como grande vantagem de utilização sua especificidade, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e invertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986; WHO, 1987).

O desenvolvimento de um inseticida biológico a partir de estirpes nacionais de *B. thuringiensis*, além das características mencionadas, poderá ser vantajoso para os produtores no aspecto econômico além de contribuir como mais uma alternativa no programa de manejo de resistência de praga a inseticidas.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar e comparar a eficiência de um produto comercial à base de *B. thuringiensis*, uma formulação em desenvolvimento utilizando uma estirpe de *B. thuringiensis* nativa (S 1905) e um inseticida químico à base de deltametrina no controle da traça-das-crucíferas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em dois campos e em um telado na Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, entre os meses de agosto de 2006 e janeiro de 2007. Utilizou-se um híbrido de repolho, Matsukase (Sakata) e os manejos para a cultura foram os recomendados para a região (FILGUEIRA, 2003).

No campo, as áreas experimentais foram compostas de 20 parcelas, sendo cada uma delas formada por quatro linhas, contendo 20 plantas cada. A distância entre as linhas e parcelas foi de 40 cm e entre plantas de 30 cm. As

duas linhas laterais e 3 plantas ao final da linha em cada parcela foram deixadas como bordadura e não foram usadas nas amostragens e na avaliação final. A área total dos campos 1 e 2 foi de 360 m² cada, sendo 30 metros de comprimento por 12 metros de largura. No telado a área foi de 190 m² sendo 25 metros de comprimento por 7,60 metros de largura.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro tratamentos e cinco repetições. Foram testadas duas formulações, uma comercial à base de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* (Dipel) na dosagem de 60 g/100L e uma em desenvolvimento produzida com a estirpe S1905 com a mesma dosagem do primeiro produto, além de um tratamento com inseticida químico à base de deltametrina na dosagem de 30mL/há e o tratamento testemunha com água. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo Extravon (30 mL/100 L de água). A estirpe S1905 em teste pertence ao banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e foi selecionada por sua alta toxicidade a insetos da ordem Lepidóptera: *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *P. xylostella* (MONNERAT *et al.*, 2006).

No telado, as áreas experimentais foram compostas de 16 parcelas, sendo cada uma delas formada por 3 linhas, contendo 13 plantas cada. A distância entre as linhas e parcelas foi de 40 cm e entre plantas de 30 cm. As duas linhas laterais e 3 plantas ao final da linha em cada parcela foram deixadas como bordadura e não foram usadas nas amostragens e na avaliação final. O delineamento foi feito em blocos ao acaso, com quatro tratamentos e quatro repetições. O trabalho foi conduzido em telado, visando reduzir a influência de condições adversas, tais como a insolação direta e a precipitação, sobre a sobrevivência das lagartas e melhor avaliar o controle dos tratamentos. O telado não tinha paredes laterais e permitia o livre acesso das mariposas às plantas. Os tratamentos experimentais utilizaram os mesmos produtos e dosagens dos experimentos de campo (

Tabela 5).

Tabela 5 - Produtos aplicados em ensaios de campo e telado para o controle de *P. xylostella* no experimento conduzido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia entre os meses de agosto de 2006 e janeiro de 2007.

Tratamento	Ingrediente ativo	Formulação	Dose
Dipel	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	Pó molhável	60 g/100L
S 1905	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	Suspensão concentrada	60 g/100L
Piretróide	Deltametrina	Líquido	30mL/há
Testemunha	Água	-	500mL/ha

Nos campos, as aplicações dos produtos comercial (Dipel) e formulado teste (estirpe S1905) foram estabelecidas após diagnóstico semanal realizado em seis plantas de cada parcela (30 plantas por tratamento) escolhidas ao acaso. Como controlo negativo foi aplicado apenas água mais o espalhante adesivo Extravon. No telado os produtos foram aplicados em seis plantas de cada parcela (24 plantas por tratamento) também ao acaso, nas quais se realizou a contagem dos furos (Foto 9) produzidos pelas lagartas da TDC nas quatro folhas centrais. Sempre que o valor da média resultasse igual ou superior a seis furos por planta, realizava-se a aplicação dos produtos nos respectivos tratamentos.

Esta avaliação foi feita pela necessidade de comparar a eficiência dos produtos. Pois através dos métodos de amostragem ou nível de controle é possível saber o momento certo de iniciar o controle, que além de controlar a praga, poderá diminuir o número de pulverizações e assim o custo de produção, beneficiando o agricultor e o meio ambiente.



Foto 9 - Danos de *P. xylostella* nas folhas de repolho. Foto: Felipe Ramos.

As avaliações do número de furos nas quatro folhas centrais foram feitas durante nove semanas e os produtos foram aplicados, quando necessário, com o uso de um pulverizador costal (Jacto) com capacidade para 20 litros dotado de bico tipo cônico nº 3. O volume de calda aplicado variou ao equivalente de 600 a 1000 litros de calda por hectare em cada pulverização ao longo dos diferentes estádios do cultivo do repolho.

A primeira avaliação foi realizada 28 dias após o transplante das mudas para o campo, no início da formação das cabeças. A irrigação por meio de aspersão foi realizada três vezes por semana.

Ao final do ciclo da cultura, 20 plantas de cada parcela dos campos 1 e 2 foram escolhidas ao acaso e avaliadas de acordo com os danos, no entanto no telado devido ao menor número de plantas foram avaliadas todas as 11 plantas de cada parcela também de acordo com os danos. Ambas as avaliações adotaram o seguinte critério de notas: 1- plantas sem nenhum furo; 2- plantas com furos inferiores a 2 mm; 3 – plantas com furos superiores a 2 mm; 4 – plantas com perda total (MONNERAT, 1995; CASTELO-BRANCO *et al.*, 1996).

Os dados obtidos na avaliação dos repolhos ao final do ciclo foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de

Student-Newman-Keuls ($p=0,05$). As análises foram feitas com auxílio do programa computacional Sigma Stat (versão 3.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infestação da traça-das-crucíferas na cultura do repolho foi menos intensa no campo 1 do que no campo 2 e no telado, podendo ser observado através dos gráficos (Figuras 5, 6 e 7). No campo 1, baseado no nível de dano, foram realizadas 3 aplicações do bioinseticida Dipel e do bioinseticida com a estirpe S1905 e seis aplicações com Deltametrina. No campo 2 foram feitas 9 aplicações do Dipel, 13 aplicações do bioinseticida com a estirpe S1905 e de Deltametrina e no telado foram feitas 8 aplicações do Dipel, 12 aplicações do bioinseticida com a estirpe S1905 e o mesmo número de aplicações com Deltametrina. O monitoramento indireto da população de *P. xylostella*, através dos danos nas folhas centrais, permitiu um número menor de aplicações que o observado por CASTELO BRANCO & GATEHOUSE (1997) de 16 aplicações de inseticida químico em apenas um cultivo com resultados equivalentes.

A variação no número de aplicações dos inseticidas e bioinseticidas é devido a menor ou maior eficiência de controle entre eles, o produto Dipel com menor número de aplicações se mostrou mais eficiente no controle. Dado este considerado importante, pois representa um menor custo com o controle da traça-das-crucíferas por cultivo.

O campo 2 e o telado apresentaram infestações mais altas que o campo 1 que podem ter ocorrido devido a existência de plantios consecutivos de repolho em áreas próximas, não possibilitando a quebra do ciclo da praga e sim o seu favorecimento devido a elevada disponibilidade de hospedeiros (Figuras 6 e 7). Este fato, que incentiva o crescimento da população da traça-das-crucíferas, poderia ser amenizado através da rotação de culturas.

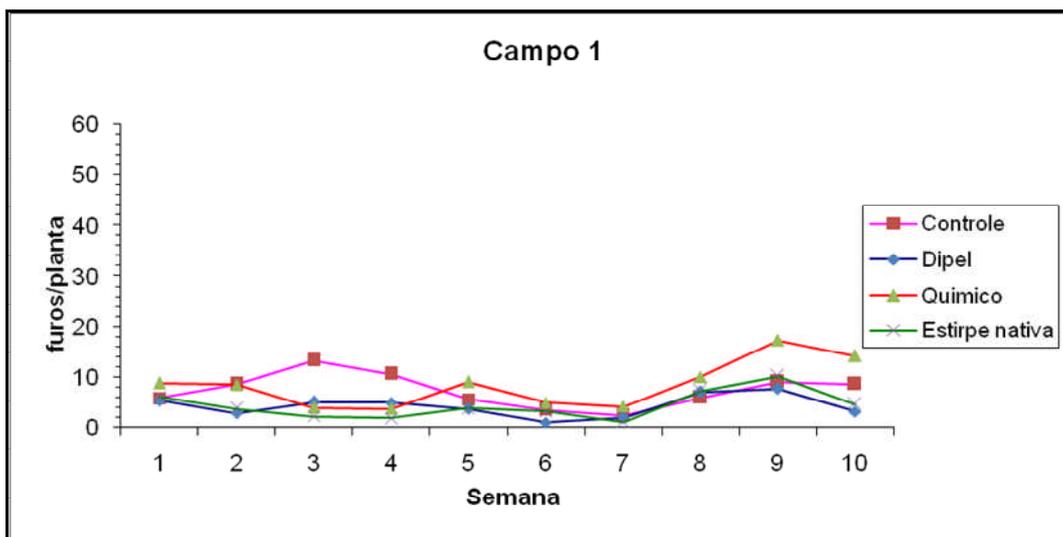


Figura 5 - Evolução do número médio de furos causados por *P. xylostella* ao longo tempo de cultivo de repolho no ensaio de campo 1 em Brasília, DF, 2006.

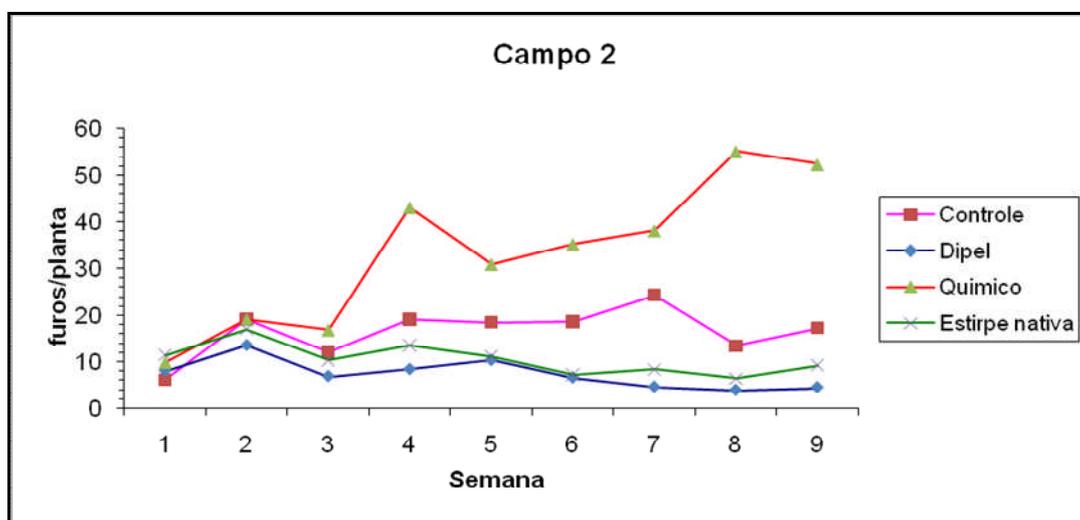


Figura 6 - Evolução do número médio de furos causados por *P. xylostella* ao longo tempo de cultivo de repolho no ensaio de campo 2 em Brasília, DF, 2006.

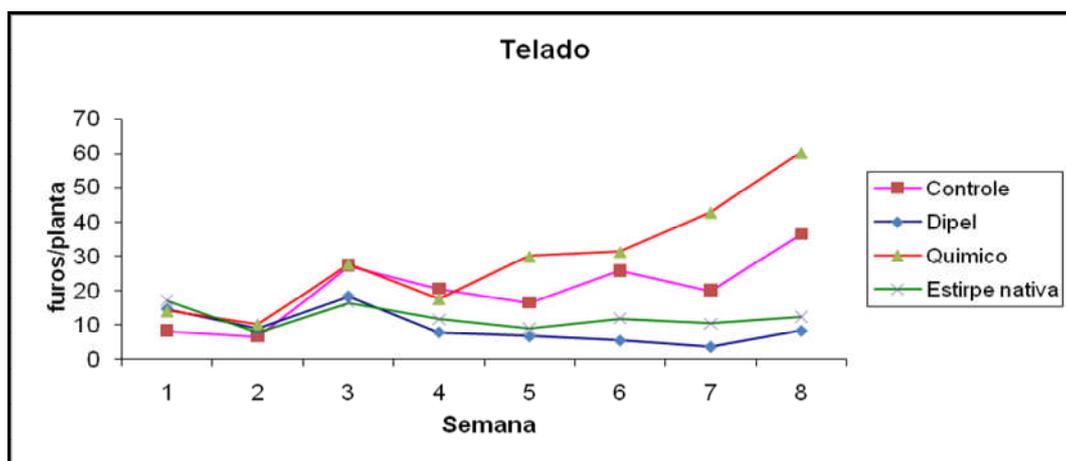


Figura 7 - Evolução do número médio de furos causados por *P. xylostella* ao longo tempo de cultivo de repolho no ensaio de telado em Brasília, DF, 2006/2007.

Com relação ao percentual de cabeças comercializáveis, o campo 1 mostrou que as parcelas tratadas com bioinseticida Dipel possibilitaram uma

produção de 88% de cabeças comercializáveis, enquanto as parcelas com bioinseticida em teste apresentaram em torno de 69% (Tabela 6). Esses valores de produção já haviam sido encontrados por MONNERAT *et al.* (2000) em parcelas tratadas com Dipel mostrando que a população local de traça-das-crucíferas continua susceptível a este bioinseticida à base de *B. thuringiensis*. Os resultados obtidos mostraram que o ataque da traça-das-crucíferas foi severo, podendo-se observar através da baixa porcentagem de repolhos comercializáveis nos tratamentos testemunha e Deltametrina.

Na avaliação com atribuição de notas para a qualidade das cabeças de repolho observou-se que os bioinseticidas Dipel e aquele com a estirpe S1905 apresentaram os melhores resultados com notas significativamente menores que os tratamentos com o químico (Deltametrina) e que o tratamento testemunha (Tabela 7), ou seja, quanto menor a nota maior a porcentagem de cabeças comercializáveis. Os inseticidas biológicos testados possuem como princípio ativo o mesmo sorotipo, *kurstaki*, de *B. thuringiensis*, sendo que a diferença está na estirpe de cada produto.

No campo 2, observou-se com relação a porcentagem de cabeças comercializáveis que a eficiência dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* foram semelhantes entre si e mostraram-se superiores ao químico com deltametrina (Tabela 6). O mesmo resultado foi observado com relação a notas atribuídas à qualidade das cabeças de repolho (Tabela 7).

Tabela 6 - Porcentagem de cabeças de repolho comercializáveis em experimento avaliando a eficiência de bioinseticidas Bt e inseticida químico no controle de *Plutella xylostella* em Brasília, DF, 2006/7.

Tratamentos	Cabeças comercializáveis (%)		
	Campo 1	Campo 2	Telado
Dipel	87,96 ± 10,75 a	61,27 ± 10,95 a	54,8 ± 6,45 a
Estirpe S1905	69,34 ± 12,36 b	77,39 ± 15,91 a	56,25 ± 31,46 a
Deltametrina	36,10 ± 7,08 c	2,05 ± 2,81 b	0 ± 0 b
Testemunha	43,41 ± 16,74 c	43,84 ± 17,85 b	3,13 ± 6,25 b

Análise de variância Campo 1 (F = 19,08; g.l.= 3; P < 0,001, Campo 2 (F = 30,075; g.l.= 3; P<0,001) e telado (F = 14,540; g.l.= 3; P<0,001) seguido de teste de comparação de médias (Student-Newman-Keuls P<0,05).

Tabela 7 - Qualidade das cabeças de repolho em experimento avaliando a eficiência de bioinseticidas Bt e inseticida químico no controle de *P. xylostella* em Brasília, DF, 2006/7.

Tratamentos	Classificação qualitativa dos repolhos (notas médias)		
	Campo 1	Campo 2	Telado
Dipel	1,33 ± 0,22 a	1,95 ± 0,28 a	1,99 ± 0,18 a
Estirpe S1905	1,70 ± 0,34 a	1,70 ± 0,29 a	2,32 ± 0,45 a
Deltametrina	2,47 ± 0,33 b	3,32 ± 0,16.b	3,74 ± 0,24 c
Testemunha	2,24 ± 0,42 b	3,15 ± 0,62 b	3,25 ± 0,30 b

Análise de variância Campo 1 (F = 11,66 g.l.= 3; P<0,001), Campo 2 (F = 23,836; g.l.= 3; P <0,001) e telado (F = 27,925; g.l.= 3; P<0,001) seguido de teste de comparação de médias (Student-Newman-Keuls P<0,05).

No telado, as parcelas tratadas com o bioinseticida Dipel e o bioinseticida com a estirpe S1905 apresentaram resultados superiores a testemunha. Neste mesmo caso foi possível observar 0% de cabeças comercializáveis no tratamento com o químico deltametrina e 3,13% na testemunha. Em outros experimentos semelhantes a este, já foram relatados danos em até 95% das cabeças de repolho colhidas em experimentos onde ocorreu ataque severo de pragas, como *P. xylostella* (SHELTON et al., 1982). Outra observação importante é que a baixa produtividade observada no telado quando comparada com os demais campos, deve-se, adicionalmente à alta infestação da praga, provavelmente a baixa fertilidade do solo. Durante a instalação do telado, a terraplanagem removeu o solo local e expôs o subsolo com deficiências nutricionais que podem ter prejudicado o desenvolvimento da cultura, apresentando uma desuniformidade bem acentuada.

Devido à elevada incidência de danos nas parcelas tratadas com o deltametrina em relação aos outros tratamentos, pode-se relatar uma baixa eficiência de controle por este produto. Este fato deve-se, provavelmente, ao uso contínuo e prolongado desse princípio ativo na região, que vem levando à seleção de populações de insetos resistentes, corroborando com os dados de

CASTELO BRANCO & GATEHOUSE (1997) E CASTELO BRANCO *et al.* (2003).

Com relação ao uso do produto químico, é importante orientar os produtores do Distrito Federal a que não apliquem por algum tempo inseticidas que tenham como princípio ativo a deltametrina, ou façam rotação de princípios ativos, até que se restabeleça uma população de *P. xylostella* susceptível a deltametrina nesta região. A deltametrina já não é eficiente em diversos locais do país, sendo o nível de persistência das populações da praga bastante elevado (CASTELO BRANCO *et al.*, 2003). Estes mesmos autores sugerem que o uso de deltametrina seja restrito para o controle de *P. xylostella*. Os resultados encontrados neste trabalho e em outros já citados acima indicam a importância da implementação de programas de manejo de resistência a inseticidas para o controle de *P. xylostella* nas diversas regiões brasileiras. Estes programas devem incluir redução do número de aplicações de inseticidas, onde os produtos devem ser empregados apenas quando a praga atingir o nível de controle.

Deve-se incentivar a rotação de inseticidas, com a utilização de produtos que possuam diferentes mecanismos de ação e que devem ser utilizados com intervalos de alternância de 21 dias, a fim de cobrir uma geração completa da praga (CASTELO BRANCO & FRANÇA, 2000). Além disso, como observado por Castelo Branco e Melo (2002), o nível de susceptibilidade das populações aos diferentes produtos empregados deve ser monitorado, a fim de que os melhores produtos para cada local sejam indicados. E, ainda, o manejo trará as vantagens de retardar o surgimento de populações de insetos resistentes e reduzirá o custo de produção devido à redução no número de aplicações, reduzindo também a contaminação ambiental (CASTELO BRANCO *et al.*, 1996).

O bioinseticida Dipel e o bioinseticida com a estirpe S1905 foram produzidos em diferentes formulações (Tabela 5). O número de aplicações do bioinseticida com a estirpe S1905 para o controle de *P. xylostella* no campo 2 e no telado foi bem superior ao campo 1 e ao bioinseticida Dipel. É provável que a variação no número de aplicações se deva a formulação, portanto novos

estudos deverão ser conduzidos para melhorar a qualidade da formulação desenvolvida para a obtenção de um bioinseticida com estirpe nativa tão eficiente quanto os formulados comerciais, de forma que o mesmo número de aplicações resulte no mesmo nível de controle, conforme já relatado por MONNERAT *et al.* (2000) e por MEDEIROS *et al.* (2004).

CONCLUSÕES

O bioinseticida contendo a estirpe S1905, selecionado a partir do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, apresentou níveis satisfatórios de controle da traça-das-crucíferas em ensaio de campo com alta infestação da praga. No entanto, seu processo de formulação ainda deve ser desenvolvido visando equiparar sua frequência de aplicação ao produto comercial disponível no mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIOCONTROLE. 2007. – **Métodos de controle de pragas** Ltda.<http://www.biocontrole.com.br/pragas/praga.php?id=plutella_xylostella> Acessado em 20 de maio de 2007.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H. **Previsão da eficiência de inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas através do uso de doses discriminantes**. Embrapa Hortaliças, Brasília. (Boletim de Pesquisa 2 da Embrapa Hortaliças). 2000.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A.G. **Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 26, p. 75-79. 1997.

CASTELO BRANCO, M.; MELO, C. A. **Resistência a abamectin e cartap em populações de traça-das-crucíferas**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 20, n. 4, p. 541-543. 2002.

CASTELO BRANCO, M.; VILLAS BOAS, G. L.; FRANÇA, F. H. **Nível de dano da traça-das-crucíferas em repolho**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 14, n. 2, p. 154-157. 1996.

CASTELO BRANCO M.; FRANÇA, F. H.; PONTES, L. A.; AMARAL, P. S. **Avaliação da suscetibilidade a inseticidas de populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 21, n. 3, p. 553-556. 2003.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura** - Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças. 2. Agrônômica Ceres, São Paulo. 412 p. 2003.

FRANÇA, F.H.; MEDEIROS, M.A. **Impacto de combinação de inseticidas sobre a produção de repolho e parasitóides associados com a traça-das-crucíferas**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v.16, n.2, p.132-135. 1998.

GODIN, C.; BOIVIN, G. **Seasonal occurrence of lepidopterous pests of cruciferous crops in Southwestern Quebec in relation to degree-day accumulations**. Can. Entomol. 130: 173-185. 1998.

MEDEIROS, P. T.; SONE, E. H.; SOARES, C. M. S.; DIAS, J. M. C. DE S.; M, R. G. **Avaliação da susceptibilidade da traça-das-crucíferas a produtos formulados a base de *Bacillus thuringiensis* em cultivo de repolho no Distrito Federal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 8p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 110. 2004)

MONNERAT, R.G. ; BATISTA, A. C. ; MEDEIROS, P. T. ; MARTINS, E. S. ; MELATTI, V. M. ; PRACA, L. B. ; DUMAS, V. F. ; MORINAGA, C. ; DEMO, C. ; GOMES, A. C. M. M. ; FALCÃO, R. ; SIQUEIRA, C. B. ; SILVA-WERNWCK, J. O. ; B, COLIN. **Screening of *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis***. Biological Control, v. 41, p. 291-295. 2006.

MONNERAT, R. G.; BORDAT, D.; CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F. H. **Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas químicos sobre a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) e seus parasitóides**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, vol. 29, n. 4, p. 723-730. 2000.

MONNERAT, R.S.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT,D.; FRUTOS, R. **Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella***. *Current Microbiology*, v.39, p.159-162, 1999.

SHELTON, A.M., J.T. ANOALORO & J. BARNARO. **Effects of cabbage looper, imported cabbage worm and diamond back moth on fresh market and processing cabbage**. Journal of Economic Entomology, 75(4): 742-745. 1982.

SILVA, A.L.; VELOSO, V.R.S.; TARDIVO, J.C.; ABREU, C.D.; SILVA, R.M.C. **Avaliação de inseticidas piretróides no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L., 1758) em repolho**. Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária, v. 23, n. 1, p. 7-12. 1993.

WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E. **The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis***. Annual Review of Microbiology: 40, 549-576. 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors***. WHO Mimeograph Document 87.3, 1987.

CAPÍTULO 2 – Avaliação do Efeito Adverso de uma Estirpe de *Bacillus thuringiensis* Tóxica a Lepidóptera sobre Espécies Não-Alvo.

RESUMO

Os agentes microbiológicos de controle (AMC) têm sido mundialmente utilizados como alternativa aos tradicionais agrotóxicos químicos. Em março de 2006, a ANVISA, o IBAMA e o MAPA publicaram uma Instrução Normativa Conjunta onde foram estabelecidos os critérios e exigências para o registro e a avaliação de um AMC. Dentre as exigências previstas na Instrução encontram-se os testes de toxicidade e ecotoxicidade para a predição de efeitos dos produtos à saúde humana e ao meio ambiente. Esses testes consistem em determinar potenciais danos a organismos não-alvo do bioinseticida. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito agudo da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1905 para o peixe *Danio rerio* (paulistinha), para o caramujo aquático *Biomphalaria glabrata* e para o camundongo C56BL/6. Para a realização dos ensaios seguiu-se os protocolos experimentais da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), que recomenda a exposição dos organismos a uma concentração máxima do agente. Para os testes com organismos aquáticos foram testadas as concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 UFC por mL de água de diluição. A água de diluição utilizada foi a água mole sintética padronizada pela ABNT. Durante 30 dias foram expostos dez peixes e dez caramujos às duas concentrações especificadas de cada estirpe, e dez peixes e dez caramujos ao controle negativo contendo apenas água mole, num volume de 3000 mL, em béqueres de 4000 mL. Os camundongos foram inoculados via oral uma única vez com 100 μ L de uma concentração de 1×10^9 UFC e monitorados por 30 dias. Ao término dos experimentos foi observado que a estirpe testada não apresentou efeito adverso agudo aos peixes, caramujos nem camundongos expostos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata*; C56BL/6.

CHAPTER 2 – EVALUATION OF THE ADVERSE EFFECT OF A *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAIN TOXIC TO THE LEPIDOPTERA ON NON-TARGET SPECIES.

SUMMARY

The microbiological control agents (MCA) have been worldily used as an alternative to the traditional chemical agro toxics. In March 2006, the ANVISA, the IBAMA, and the MAPA published a Combined Normative Instruction where there were established the criteria and the exigencies to the registration and the evaluation of a MCA. Among the exigencies anticipated in the Instruction you can find the tests of toxicity and eco-toxicity for the prediction of the effects of the products to the human health and to the environment. These tests consist on determining potential damages to non-target organisms of the bio-insecticide. In this context, the objective of this work was to evaluate the sharp effect of the strain of *Bacillus thuringiensis* S1905 to the fish *Danio rerio* (paulistinha), to the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* and to the mice C57BL6. To accomplish the tests, the experimental protocols of the Environmental Protection Agency of the United States (EPAUS) were followed, which recommend the exposal of the organisms to a maximum concentration of the agent. For the tests with the aquatic organisms it was tested the concentrations of 1×10^6 and 1×10^7 UFC per ml of diluting water. The diluting water used was the soft synthetic water standardized by the ABNT. On the period of 30 days, ten fishes and ten snails were exposed to the two specified concentrations of the strain, and ten fishes and ten snails to the negative control containing only soft water, on a volume of 3000 ml, in 4000 ml beckers. The mice were inoculated via oral one single time with 100 μ L of a concentration of 1×10^9 UFC and monitored for 30 days. By the end of the experiment it was noticed that the tested strain did not present sharp adverse effect on the fishes, snails nor mice exposed.

Key words: eco-toxicology, *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata*, C57BL6.

INTRODUÇÃO

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU) em Estocolmo, por René Truhaut. Em 1976 a sua definição foi publicada como “Ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (TASQA, 2008). Foram definidos também os direcionamentos dos estudos ecotoxicológicos, os quais compreendem:

- Estudo das emissões e entradas de poluentes no ambiente abiótico, distribuição e destino nos diferentes compartimentos;
- Estudo da entrada e destino dos poluentes nas cadeias biológicas e suas formas de transferência como alimento via cadeia trófica;
- Estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos tóxicos dos poluentes ao ecossistema com conseqüências ao homem (TRUHAUT, 1977).

Mais tarde, SANTOS (2003) definiu a ecotoxicologia como a ciência que estuda os efeitos causados pelos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos, particularmente sobre populações e comunidades em seus ecossistemas. Os estudos ecotoxicológicos são aqueles utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, tendo o objetivo de permitir a avaliação ambiental de substâncias nocivas ao ambiente, como por exemplo, agrotóxicos, preservativos de madeiras, produtos biológicos, dispersantes químicos, Organismos Geneticamente Modificados. Assim, os estudos ecotoxicológicos são instrumentos fundamentais para monitorar e prevenir os crescentes níveis de poluição, constituindo uma base de apoio essencial a uma política correta de gestão de recursos ambientais (MASSARO, 2006).

Segundo ZAGATTO & BERTOLETTI (2006), para a avaliação ecotoxicológica de um determinado ambiente é fundamental ter conhecimento

das fontes de emissão dos poluentes, bem como suas transformações, difusões e destinos no ambiente, e os riscos potenciais desses poluentes à biota.

O crescimento urbano e industrial é um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da quantidade e complexidade dos resíduos que são lançados no meio ambiente, os quais provocam sérios problemas ecológicos e toxicológicos para a maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (BARBOSA, 2000).

Os ambientes naturais de água doce são os principais receptores da maioria das substâncias tóxicas produzidas por atividades industriais, domésticas e agrícolas que são liberadas no meio ambiente. As atividades ligadas à agricultura causam danos à biota aquática através da introdução de defensivos agrícolas, enquanto que as atividades industriais contribuem com quantidades consideráveis de compostos químicos tóxicos persistentes, tais como os metais pesados. Embora os sistemas aquáticos sejam adaptados com uma variedade de mecanismos físicos, químicos e biológicos, através dos quais as substâncias tóxicas podem ser assimiladas sem sérias implicações para o ecossistema, quando os contaminantes químicos atingem níveis superiores à capacidade de assimilação das águas, eles podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento, o crescimento, a reprodução, ou comportamento (movimento) dos organismos (RAND *et al*, 1995).

Por outro lado, deve-se considerar também que os problemas decorrentes dos efeitos tóxicos nesses ecossistemas não se restringem apenas aos desequilíbrios ecológicos provocados nos corpos de água receptores, mas podem, em última análise, afetar a saúde humana, em decorrência dos fenômenos de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar e da persistência dos poluentes tóxicos na água que será utilizada para o consumo humano, fins recreacionais ou irrigação (COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB, 1992a).

Nos estudos ecotoxicológicos, a toxicidade de uma substância ou efluente, bem como do corpo receptor e sedimento, pode ter efeitos agudos ou

crônicos sobre os organismos. Os efeitos agudos são respostas bruscas e rápidas que os organismos apresentam quando expostos a um estímulo, sendo normalmente a letalidade ou imobilidade os efeitos mais comuns (RAND & PETROCELLI, 1985). Os efeitos crônicos são aqueles que produzem efeitos deletérios aos organismos como alterações na reprodução, crescimento, comportamento, longevidade, entre outros (CETESB, 1996). Ambos os efeitos são determinados por meio dos testes de toxicidade, nos quais uma quantidade conhecida de organismos é exposta ao agente estressante por períodos conhecidos de tempo e, posteriormente, os efeitos são avaliados quanto à sobrevivência ou mortalidade dos organismos, bem como efeitos comportamentais e fisiológicos (RAND *et al*, 1995).

A Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental é baseada em estudos laboratoriais que demonstram as características do produto, suas propriedades físico-químicas, sua toxicidade a diversos níveis tróficos (microrganismos, minhocas, microcrustáceos, algas, peixes, aves, abelhas e mamíferos), bioacumulação, persistência (biodegradabilidade do solo, hidrólise e fotólise) e transporte (mobilidade, adsorção/desorção e solubilidade), bem como os potenciais mutagênicos, carcinogênicos e embriofetotóxicos (SANTOS, 2003).

A inserção dos ensaios na ecotoxicologia como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, a exemplo da integração da ação de poluentes. Como os seres vivos respondem a estímulos ante a qualidade ambiental, nestes ensaios são usados organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (algas, crustáceos, peixes) para avaliação da toxicidade de várias matrizes, por exemplo, águas e efluentes (TASQA, 2008).

Atualmente, vários ensaios de toxicidade estão padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações tais como ABNT, ISO, EPA, ASTM, OECD (TASQA, 2008).

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da estirpe S 1905 de *Bacillus thuringiensis* em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, de peixes da espécie *Danio rerio* e de camundongos da linhagem C56BL/6 e da eliminação desta bactéria em camundongos da linhagem C57BL/6.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade aguda da estirpe S1905 crescida em meio NYSM para caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*;
- Avaliar a toxicidade aguda da estirpe S1905 crescida em meio NYSM para peixes da espécie *Danio rerio*;
- Avaliar a toxicidade aguda da estirpe S1905 crescida em meio NYSM para camundongos da linhagem C57BL/6;
- Quantificar a taxa de eliminação de esporos da estirpe S1905 inoculada em camundongos da linhagem C57BL/6.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxicidade Aguda para Peixes

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados. Para a realização dos ensaios com peixes foram seguidas às orientações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996b) e dos Protocolos de Testes Toxicopatológicos em Organismos Não-Alvo da Embrapa Meio Ambiente (Jonsson & Maia, 1999). Foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio* (paulistinha), adquirido de fornecedor comercial do Distrito Federal. Essa espécie é recomendada pelos protocolos e amplamente empregada no Brasil para avaliação da toxicidade de substâncias químicas. O método consistiu na exposição dos peixes as concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro de água de diluição. A água de diluição é a água mole sintética de dureza entre 40 e 48 mg/L em CaCO₃ e pH entre 7,2 e 7,6, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004b). O teste teve duração de 30 dias, com

observação diária, troca de solução duas vezes por semana e registro dos dados tais como alterações no comportamento, sintomas de patogenicidade ou mortalidade. Os peixes foram distribuídos em três grupos: controle negativo exposto somente à água mole sintética, sem o microorganismo testado; controle positivo exposto ao produto inativado por autoclavação; e tratado, exposto via água de diluição ao produto contendo pelo menos 10^6 esporos por mililitro de água. Para a exposição dos grupos foram usados copos Beaker de 3000 mL, com 10 peixes por copo em triplicata.

Para a realização dos ensaios, no presente estudo, foram utilizados peixes adquiridos de fornecedor comercial no DF, com comprimento variando de 2,5 cm a 3,0 cm, e foram realizados testes estáticos, ou seja, sem renovação da solução teste.

Toxicidade Aguda para Caramujos

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados. Foram seguidas as orientações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996b), dos Protocolos de Testes Toxicopatológicos em Organismos Não-Alvo da Embrapa Meio Ambiente (JONSSON & MAIA, 1999) e de outras experiência (OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 2000; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2004). Foram utilizados caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, cultivados no laboratório (Foto 10) e utilizados para a avaliação da toxicidade de substâncias químicas.

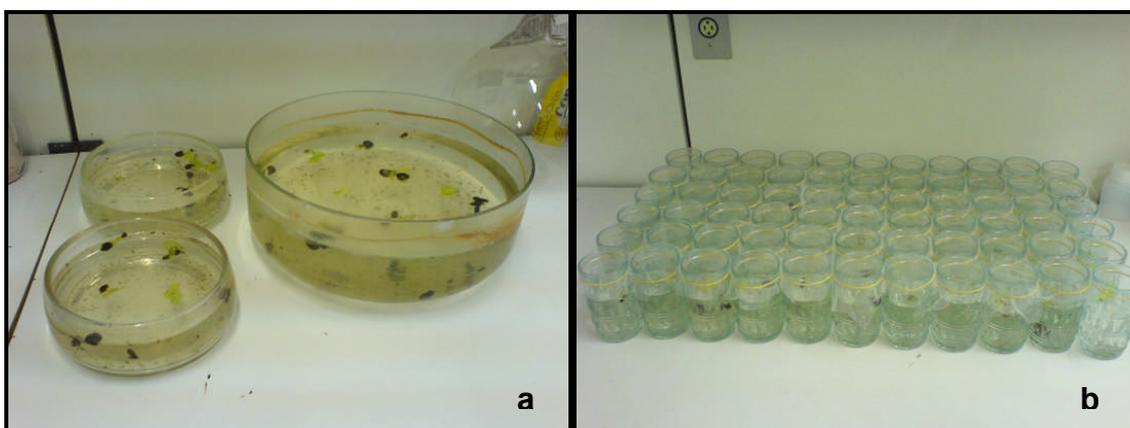


Foto 10. Criação de *Biomphalaria glabrata* no Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados. a) Adultos de *Biomphalaria glabrata*, b) Juvenis de *Biomphalaria glabrata*. Fotos: Felipe Ramos.

O método consistiu na exposição dos caramujos as concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro de água de diluição. A água de diluição é a água mole sintética de dureza entre 40 e 48 mg/L em CaCO_3 e pH entre 7,2 e 7,6, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004). O teste teve duração de 30 dias, com observação diária, troca de solução duas vezes por semana e registro dos dados tais como alterações no comportamento, sintomas de patogenicidade ou mortalidade. Os caramujos foram distribuídos em três grupos: controle negativo exposto somente à água mole sintética, sem o microorganismo testado; controle positivo exposto ao produto inativado por autoclavação; e tratado, exposto via água de diluição ao produto contendo pelo menos 10^6 esporos por mililitro de água. Para a exposição dos grupos foram usados copos Beaker de 3000 mL, com 10 caramujos por copo em triplicata.

Toxicidade/Patogenicidade Oral Aguda para Camundongos

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, seguindo as orientações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996a), dos Protocolos de Testes Toxicopatológicos em Mamíferos da Embrapa Meio Ambiente (CASTRO *et al.*, 1999). O método consistiu na administração de uma dose única da estirpe S 1905, via oral, aos animais experimentais, com observações clínicas (alteração de comportamento) e de mortalidade que duraram 30 dias. Foram utilizados dezoito camundongos C57BL/6 fornecidos pelo Biotério do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, na faixa etária de 8 a 12 semanas. Foram selecionadas fêmeas nulíparas e não-grávidas. A variação de peso entre os animais estava na faixa de $\pm 20\%$. Quanto à nutrição os animais permaneceram em jejum a partir da noite anterior à administração das doses, posteriormente aguardou-se de 3 a 4 horas para serem oferecidas a ração e a água, que a partir desse momento foi oferecida à vontade. Os animais foram distribuídos em três grupos: grupo controle negativo com três machos e três fêmeas, grupo controle positivo com três machos e três fêmeas e grupo tratado com três machos e três fêmeas. O grupo controle positivo foi inoculado com a mesma quantidade da estirpe do grupo testado, inativada por autoclavação. O grupo testado foi inoculado via oral com uma dose única de 100 μL contendo

10⁹ esporos por mililitro por animal. Os grupos foram avaliados por 30 dias, observando-se sinais clínicos e sobrevivência.

Taxa de Eliminação (clearance) de Camundongos

Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para o isolamento de *B. thuringiensis* das fezes e órgãos (intestino e pulmão), estes foram pesados e armazenados em “ependorfs” no refrigerador por 24 horas para uma melhor dissolução das amostras. Após as 24 horas foi adicionado 500 µl de H₂O destilada e autoclavada, em seguida as amostras foram maceradas com bastão de vidro esterilizado, foi adicionado mais 500 µl de H₂O destilada e autoclavada, e submetidas ao choque térmico (12 min → 80°C / 5 min → 0°C). As amostras foram agitadas em vórtex e 100 µl foi riscado em meio ágar seletivo para *B. thuringiensis* (Penicilina). As placas riscadas foram postas na estufa por 22 horas para posterior leitura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o término da exposição, foi observada ausência de mortalidade e de quaisquer sintomas de intoxicação, tanto nos peixes como nos caramujos, dado esse evidenciando que, de acordo com o protocolo americano, as estirpes testadas não apresentaram efeito adverso agudo aos peixes expostos da espécie *Danio rerio*, nem aos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.

Autores como BOISVERT & BOISVERT (2000) e MERRITT et al. (1989) realizaram estudos ecotoxicológicos expondo invertebrados aquáticos como *Daphnia magna*, *Cyclops* sp. e *Rivulogammarus pulex*, além de moluscos, planárias e anfíbios ao *B. thuringiensis* onde não foram observados evidências de efeitos sobre essas comunidades de espécies.

Os resultados encontrados nesse estudo são semelhantes aos resultados coletados pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999) onde em estudo com várias espécies de peixes expostos por 30 dias a concentrações entre 10⁹ e 10¹⁰ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, não houve evidências de mortalidade, patogenicidade ou infectividade. MITTAL et al.

(1994) também não observou mortalidade em peixes da espécie *Poecilia reticulata* alimentadas com larvas contaminadas por inseticidas biológicos contendo *B. thuringiensis*. Em outros trabalhos levantados pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999), pesquisadores observaram mortalidade de 20% das trutas exposta ao *B. thuringiensis kurstaki* durante 32 dias, no entanto essa mortalidade foi atribuída à excessiva competição por alimento na água, extremamente turva pela presença das altas concentrações do microrganismo.

Os dados obtidos nos experimentos com camundongos mostram que a estirpe S1905 do *B. thuringiensis* não apresentou toxicidade, patogenicidade nem acúmulo de esporos sobre o organismo de camundongos C57BL/6 corroborando com os dados obtidos por MCCLINTOCK *et al*, (1995). INNES & BENDELL (1989), em estudos com populações de pequenos mamíferos alimentados com insetos contamiados com uma formulação comercial de *B. thuringiensis kurstaki* avaliados por 90 dias, não observaram efeitos adversos nessas populações.

A tabela 8 apresenta a CL₅₀ da estirpe S 1905 e do *B. thuringiensis* subespécie. *kurstaki* (Btk) padrão para as espécies de lepidópteros alvo *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Plutella xylostella* (MONNERAT, 2006). Comparando esses dados com os dados da tabela 9, onde são apresentadas as doses de *B. thuringiensis* às quais as espécies não-alvo foram expostas nesse trabalho, observa-se que as doses utilizadas nesse trabalho são da ordem de 10⁴ a 10⁹ vezes superiores às doses utilizadas com eficiência no controle das espécies consideradas alvo.

Tabela 8. Toxicidade de isolados de *B. thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *P. xylostella*. Fonte: MONNERAT, (2007).

Estirpe	<i>S. frugiperda</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>P. xylostella</i>
	CL ₅₀ (ng/cm ²)	CL ₅₀ (ng/cm ²)	CL ₅₀ (µg/cm ²)
S 1905	18 (03 – 43)	3.3 (0.9 – 7.0)	1.46 (0.51 – 3.94)
Btk	285 (201 – 418)	13.7 (9.0 – 20.0)	2.82 (0.95 – 7.12)

Tabela 9. Espécies não-alvo expostas a estirpe S1905 e suas doses administradas.

Espécie	Dose Aplicada (esp/mL)	CL₅₀
<i>Danio rerio</i>	10 ⁶ - 10 ⁷	_____
<i>Biomphalaria glabrata</i>	10 ⁶ - 10 ⁷	_____
Camundongo	10 ⁹	_____

Como pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 10), as concentrações utilizadas nas espécies não-alvo não foram suficientemente altas para causar a mortalidade destas, portanto não foi possível se obter um cálculo da CL₅₀ para essas espécies.

Tabela 10. Comparação de concentrações utilizadas em diferentes espécies alvo e não-alvo da estirpe S 1905.

Espécies	CL₅₀	Concentração em esporos S 1905
<i>S. frugiperda</i>	18 ng/cm ² (03 – 43)	297 esp/cm ²
<i>A. gemmatalis</i>	3.3 ng/cm ² (0.9 – 7.0)	54,45 esp/cm ²
<i>P. xylostella</i>	1.46 µg/cm ² (0.51 – 3.94)	24 x 10 ³ esp/mL
<i>D. rerio</i>	_____	10 ⁷ esp/mL
<i>B. glabrata</i>	_____	10 ⁷ esp/mL
Camundongo	_____	10 ⁹ esp/mL

Pequenas contaminações por *B. thuringiensis* foram detectadas durante a fase de isolamento desta bactéria das fezes dos camundongos. Essas contaminações são esperadas visto que existem dificuldades em se manter o ambiente de criação dos animais totalmente asséptico. As contaminações encontradas podem ser desconsideradas, pois pelo número de esporos encontrados não configura que realmente esteja ocorrendo a eliminação significativa por bactérias inoculadas nos animais.

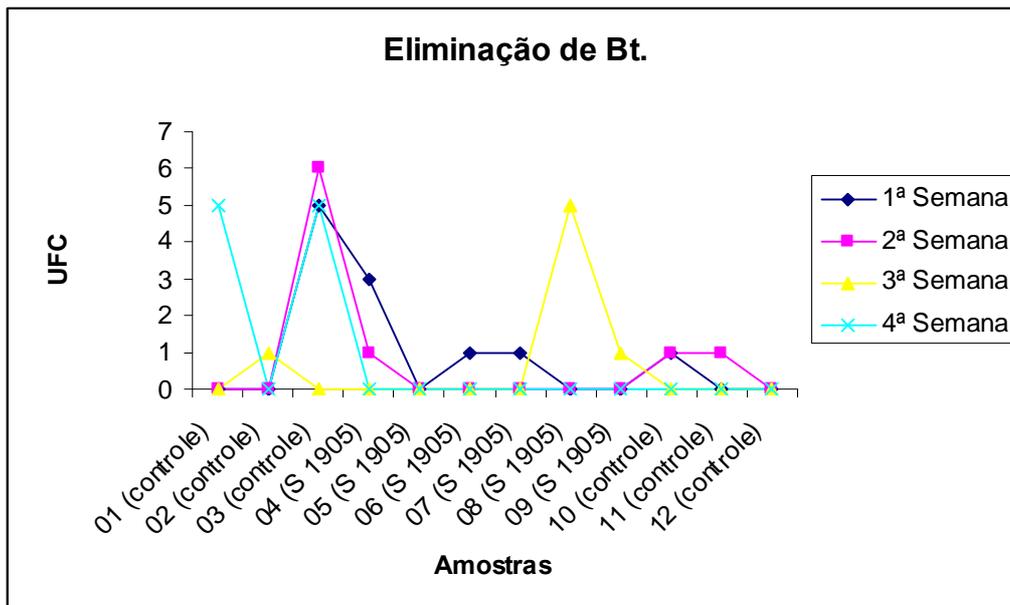


Figura 8. Gráfico da taxa de eliminação de *B. thuringiensis* de camundongos ao longo de 4 semanas de observação.

A alternância de esporos encontrados nos animais testados sugere que apenas quatro semanas não são suficientes para que haja uma eliminação completa dos esporos pelo organismo dos animais. Essa conclusão toma como base os estudos realizados por SIEGEL & SHADDUCK (1990), que injetaram, intraperitonealmente, soluções de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* em ratos. Colônias de *B. sphaericus* foram recuperadas até 67 dias após a injeção e colônias de *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* foram recuperados durante 80 dias. Neste estudo também não foram encontradas evidências de infecções por nenhuma das bactérias injetadas nos animais.

Os esporos encontrados no controle podem ser considerados como contaminações ocasionadas pela dispersão dos esporos de *Bt* pelo ar (por ser uma bactéria esporulante essa situação é aceitável) ou pela manipulação dos animais controle depois de serem manipulados os animais testados. Esse fato demonstra que as metodologias utilizadas nos experimentos de inoculação e eliminação do *Bt* em camundongos apresentam falhas, necessitando, dessa forma, de adaptações e ajustes a fim de se evitar contaminações e fornecendo dados mais claros e confiáveis.

Tabela 11 - Órgãos analisados após a 4^o semana de coleta.

Amostra (nº)	Órgão	Tratamento	Antibiótico	UFC (nº)
04	1	S 1905	Penicilina	0
04	2	S 1905	Penicilina	0
04	3	S 1905	Penicilina	0
04	4	S 1905	Penicilina	4
05	1	S 1905	Penicilina	0
05	2	S 1905	Penicilina	0
05	3	S 1905	Penicilina	0
05	4	S 1905	Penicilina	2
06	1	S 1905	Penicilina	0
06	2	S 1905	Penicilina	0
06	3	S 1905	Penicilina	0
06	4	S 1905	Penicilina	0
07	1	S 1905	Penicilina	0
07	2	S 1905	Penicilina	0
07	3	S 1905	Penicilina	0
07	4	S 1905	Penicilina	0
08	1	S 1905	Penicilina	0
08	2	S 1905	Penicilina	0
08	3	S 1905	Penicilina	0
08	4	S 1905	Penicilina	0
09	1	S 1905	Penicilina	0
09	2	S 1905	Penicilina	0
09	3	S 1905	Penicilina	0
09	4	S 1905	Penicilina	0

A avaliação do pulmão e do intestino dos camundongos inoculados com a estirpe ativa de *B.thuringiensis* após o término do período de observação não apresentou crescimento bacteriano a não ser de pequenas contaminações já esclarecidas nos casos acima.

CONCLUSÕES

A estirpe testada não apresentou efeito adverso agudo aos peixes expostos da espécie *Danio rerio*, nem aos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* nas concentrações testadas. Esses dados mostram que, se utilizada corretamente, a estirpe testada tem baixa periculosidade ambiental para espécies de peixes e camundongos.

A estirpe testada não apresentou toxicidade ou patogenicidade para camundongos da linhagem C57BL/6 demonstrando dessa forma ser inócua a mamíferos.

A metodologia utilizada para a observação da eliminação das bactérias em camundongos necessita de melhorias visando, sobretudo, a obtenção de dados mais confiáveis, garantindo a ausência de contaminação no material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda-Método de ensaio com peixes**. NBR 15088, mai, 2004.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp.** (Cladocera, Crustacea). NBR 12713, Rio de Janeiro: ABNT, 2004b.

BARBOSA, R.M. **Avaliação do impacto de lodos de estações de tratamento de água à biota aquática através de estudos ecotoxicológico**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000. 200 p.

BOISVERT, M. & BOISVERT, J., **Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments**. *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 2000. 517-561.

CASTRO, V.L.S.S.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, G.J.; DE NARDO, E.A..B. & OLIVEIRA, M.C.B. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. II. Testes Toxicopatológicos em mamíferos**. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 40p. (EMBRAPA MEIO AMBIENTE, Documento, 10).

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo. Norma Técnica L5 018. 1996. 285 p.

INNES, D. G. L. & BENDELL, J. F., **The effects on small-mammal populations of aerial applications of *Bacillus thuringiensis*, fenitrothion, and Matacil^(R) used against jack pine budworm in Ontario**. *Can. J. Zool.*, 67: 1989. 1318-1323.

JONSSON, C.M. & MAIA, A.H.N. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes em organismos não-alvo do ambiente aquático**. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33p. (EMBRAPA MEIO AMBIENTE, Documento, 11).

MASSARO, F.C. **Estudos Ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidária: Hydrozoa)**. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006. 108 p.

MERRITT, R. W., WALKER, E. D., WILZBACH, M. A., CUMMINS, K.W. & MORGAN, W. T., **A broad evaluation of Bti for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget**

effects on invertebrates and fish. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 5: 1989. 397-415.

MITTAL, P. K., ADAK, T. & SHARMA, V. P., **Comparative toxicity of certain mosquicidal compounds to larvivorous fish, *Poecilia reticulata*.** *Indian J. Malariol.*, 31: 1994. 43-47.

McCLINTOCK, J.T.; SCHAFFER, C.R.; SJOBLAD, R.D. **A Comparative Review of the Mammalian Tixicity of *Bacillus thuringiensis* – Based Pesticide.** *Pestic. Sci.* 1995 45, 95-105

OLIVEIRA-FILHO, E.C., FARIA, M.R. & CASTRO, M.L.M.P. **Regulamentação de produtos biológicos para o controle de pragas agrícolas.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 33p. (EMBRAPA-CENATGEN. Documentos, 119).

OLIVEIRA-FILHO, E.C., & PAUMGARTTEN, F.J.R. **Toxicity of *Euphorbia milli* látex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.46, p. 342-350, 2000.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications.** Washington USA, Hemisphere Publising, 1985. 666 p.

RAND, G.M.; WELL, P.G.; McCARTY, L.S. **Introduction to aquatic toxicology.** In: RAND, G.M. *Fundamentals of aquatic toxicology* 2nd. Edition, Effects, enviromental fate Introduction, and risk assessment. Taylor & Francis. 1995.

SANTOS, E.R. **Ecotoxicologia.** Seminário Internacional sobre Sistema de Qualidade Laboratorial, São Paulo, 21-24 de set. 2003. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/seminario/Elisa%20Rosa%20dos%20Santos_IBAMA.pps#256,1,Slide 1](http://www.anvisa.gov.br/reblas/seminario/Elisa%20Rosa%20dos%20Santos_IBAMA.pps#256,1,Slide%201)> acesso em 03/04/2008

SIEGEL JP, SHADDUCK JA. **Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis from mammals.** *J Econ Entomol.* 1990 Apr;83(2):347-55.

TASQA, Laboratórios TASQA. **TASQA Notícias, Ecotoxicologia.** Disponível em <http://www.tasqa.com.br/noticia/44/ecotoxicologia> acesso em 07/04/2008

TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: objectives, principles and Perspectives.** *Ecotox Environ Safety* 1: 151- 173. 1977

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) **Microbial pesticide test guidelines. OPPTS 885.3050. Acute oral toxicity/pathogenicity.** Washington-DC: USEPA. 1996a. 8p. (EPA 712-C-96-315).

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY)
Microbial pesticide test guidelines. OPPTS 885.4200. **Freshwater fish testing**,
Tier I. Washington-DC: USEPA. 1996b. 6p. (EPA 712-C-96-332).

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), ***Bacillus thuringiensis***.
Environmental Health Criteria, 217. WHO, Geneve, 1999. 105 p.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática, princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima, 2006.