



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CURSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LETÍCIA SANTOS ABRUNHOSA**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA  
PRODUÇÃO "ON FARM" DE BIOINSETICIDA**

Brasília

2019

**LETÍCIA SANTOS ABRUNHOSA**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA  
PRODUÇÃO "ON FARM" DE BIOINSETICIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de  
graduação em farmácia da  
Faculdade de Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção do  
título de bacharel em Farmácia.

**Orientadora: Profa. Dra. Yris  
Maria Fonseca**

**Coorientadora: PhD Rose Gomes  
Monnerat Solon de Pontes**

Brasília  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

Queria agradecer à minha mãe, por me apoiar e nunca sair do meu lado nos momentos difíceis.

Queria agradecer à minha vó, por me ensinar a ser uma pessoa mais forte.

Queria agradecer à professora Pérola e Dra Rose, por serem minhas segundas mães na UnB e na Embrapa.

Queria agradecer aos meus amigos de curso, por todo o apoio, diversão e aprendizado.

Queria agradecer também aos meus amigos de laboratório, por toda a ajuda e por tornarem meus dias melhores.

## RESUMO

A produção "on farm" de bioinseticidas consiste na produção, em propriedade rural, de defensivos agrícolas formulados a partir de organismos biológicos, para uso e aplicação no controle de pragas da lavoura. Traz como desvantagem a falta de condições adequadas para a fermentação, com uso de materiais não esterilizados e fermentadores inadequados, o que gera riscos de contaminação por micro-organismos não desejáveis. Tal fato pode ser prejudicial não só para a lavoura, mas principalmente aos seres humanos que estarão em contato com o defensivo contaminado. Buscando simplificar a verificação de possíveis patógenos presentes em bioinseticidas produzidos "on farm", foi proposto o desenvolvimento de um kit composto por meios de cultura comumente utilizados em laboratório para controle de qualidade microbiológico. O objetivo da pesquisa foi avaliar a contaminação de meios de crescimento microbiano utilizados para produção "on farm" de bioinseticidas a partir deste kit proposto comercialmente, utilizando como base a metodologia, segundo determinação da ANVISA, para controle microbiológico da água. Os meios de produção "on farm" foram incubados por 72 horas, a 30 °C, 200 rpm em agitador. Um meio de crescimento microbiano previamente esterilizado contendo inoculação de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) serviu como controle para a comparação dos resultados. As amostras foram diluídas até 1:1000, plaqueadas e incubadas por 12 horas a 36 °C. A análise do crescimento foi realizada a partir de contagem de micro-organismos viáveis pelo método de cultura em superfície e o resultado foi expresso em UFC/mL. Houve crescimento de micro-organismos patogênicos nas avaliações realizadas, indicando que o kit de avaliação de contaminação proposto cumpre seu objetivo. Os resultados obtidos servirão para a produção de um manual de instruções, informando para o agricultor, por exemplo, como deve ser feita a conservação do kit, a metodologia e análise dos resultados.

**Palavras-chave:** produção *on farm*; controle de qualidade; micro-organismos patogênicos.

## ABSTRACT

"On farm" production of bioinsecticides consists on the production, on a rural property, of pesticides formulated from biological organisms for use and application in crop pest control. It has as disadvantage the lack of adequate conditions of fermentation, made with unsterile materials and inadequate fermenters, which creates risks of contamination by undesirable microorganisms. This fact can be harmful not only to the tillage, but especially to humans who will be in contact with the contaminated defensive. Aiming to simplify the verification of possible pathogens present in bioinsecticides produced on farm, it was proposed to develop a kit composed of culture media commonly used in the laboratory for microbiological quality control. The objective of this research was to evaluate the contamination of microbial growth media used on "on farm" production of bioinsecticides from this commercially proposed kit, using the methodology, as determined by ANVISA, for microbiological control of water. The "on farm" media were incubated for 72 hours at 30 °C, 200 rpm on shaker. A previously sterile microbial growth medium containing *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) inoculation served as a control for comparison of results. Samples were diluted to 1: 1000, plated and incubated for 12 hours at 36 °C. Growth' analysis was performed by counting viable microorganisms by the surface culture method and the result was expressed in CFU / mL. There was growth of pathogenic microorganisms in the evaluations performed, indicating that the proposed contamination assessment kit fulfills its objective. The results will be used to produce an manual, informing the farmer, for example, how the conservation of the kit should be done, the methodology and analysis of the results.

**Keywords:** on farm production; quality control; pathogenic microorganisms.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. OBJETIVO</b> .....	10
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
3.1 AGRICULTURA NO BRASIL .....	11
3.1.1 Controle biológico.....	13
3.1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> e Proteínas Cry.....	14
3.1.3 Produção <i>on farm</i> .....	16
3.2 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO.....	17
3.2.1 Principais fontes de contaminação microbiológica.....	18
3.2.2 Micro-organismos.....	19
3.2.2.1 Bactérias.....	19
3.2.2.1.1 Bactérias patogênicas.....	19
3.2.2.1.1.1 <i>Salmonella</i> .....	19
3.2.2.1.1.2 <i>E. coli</i> .....	20
3.2.2.1.1.3 Estreptococo.....	22
3.2.2.1.1.4 Enterococo.....	23
3.2.2.1.1.5 Coliformes termotolerantes.....	23
3.2.2.2 Fungos e leveduras.....	24
3.2.2.2.1 Fungos patogênicos.....	25
3.2.2.2.1.1 <i>Aspergillus</i> .....	25
3.2.2.2.1.2 <i>Candida</i> .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> : cultivo da estirpe, microscopia e pureza.....	27
4.2 Kit proposto para controle de qualidade microbiológico em produção <i>on farm</i> de bioinseticidas .....	28
4.3 Metodologia.....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1 Microscopia e pureza .....	35
5.2 Avaliação da presença de contaminantes .....	36

<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil é uma das principais bases da economia do país. Em um país com alto índice de insetos devido ao clima tropical, o desafio dos agricultores é reduzir a aplicação dos pesticidas para também reduzir o custo da produção e os riscos associados para a saúde humana e os recursos naturais.

O controle biológico consiste no controle de pragas e insetos vetores de doenças, feita através de micro e macro organismos vivos, realizado por seus inimigos naturais, é um dos componentes do programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP). É uma opção benéfica para o combate de pragas e patógenos, e vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto ambiental, especificidade e desenvolvimento de resistência.

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva conhecida pela produção das  $\delta$ -endotoxinas: *Cry* e *Cyt*, que possuem atividade inseticida. Produtos a base da proteína *Cry* são comercializados para a realização do controle biológico de lavouras devido à sua alta especificidade e inocuidade aos demais organismos vivos.

A produção "on farm" de bioinseticidas consiste na produção, em propriedade rural, de defensivos agrícolas formulados a partir de organismos biológicos, para uso e aplicação no controle de pragas da lavoura. O crescimento da produção "on farm" se deu devido ao alto custo de defensivos agrícolas vendidos comercialmente, à seleção de populações resistentes aos produtos comercializados e como uma alternativa ao uso de agrotóxicos químicos. No entanto, a produção "on farm" de produtos biológicos traz como desvantagem a falta de condições adequadas para a fermentação, com uso de materiais não esterilizados e fermentadores inadequados, o que gera riscos de contaminação por micro-organismos não desejáveis. Tal fato pode ser prejudicial não só para a lavoura, mas principalmente aos seres humanos que estarão em contato com o produto final obtido da fermentação realizada nas propriedades rurais.

As técnicas de controle de qualidade de produtos não estéreis, como os bioinseticidas "on farm" comentados anteriormente, asseguram que a carga microbiana presente no produto não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do ser humano. Buscando simplificar a verificação de possíveis patógenos presentes no bioinseticida produzido "on farm", foi desenvolvido um kit



composto por meios de cultura comumente utilizados em laboratório para controle de qualidade microbiológico.

O seguinte trabalho tem como objetivo validar um kit para ensaio microbiológico de produtos “on farm” seguindo a metodologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para controle microbiológico da água. Os resultados obtidos servirão para a produção de um manual de instruções, informando para o agricultor, por exemplo, como deve ser feita a conservação do kit, a metodologia e análise dos resultados.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo desse trabalho foi avaliar a contaminação de meios de crescimento microbiano utilizados para produção "on farm" de bioinseticidas utilizando um kit proposto comercialmente para avaliação da contaminação microbiológica no local da produção.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 AGRICULTURA NO BRASIL**

De terras vastas e clima variado, que permite a adaptação de diferentes cultivares, o Brasil possui características ideais para ser um dos maiores celeiros do mundo. Os números, ano após ano, comprovam tal pujança. Segundo dados da Confederação Nacional da Agricultura (CNA), o ano de 2019 será de uma safra de grãos ainda maior, em comparação ao ano anterior, com estimativa de 228 milhões de toneladas. Destaque para a produção de soja, que na safra 2018/2019, deve crescer 6% em relação à safra anterior, com boas condições climáticas em praticamente todos os estados (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA, 2018).

As previsões se somam à perspectiva de crescimento de 2% no Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio e uma alta de 4,3% no Valor Bruto da Produção (VBP), que dá uma estimativa de geração de renda no meio rural (BRASIL, 2018).

Mais especificamente no segmento de grãos, o destaque na produção nacional vai para a soja, onde o Brasil segue como segundo maior produtor do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que detalha dados sobre área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto das lavouras, apontou que, em 2018, do total de quase 79 milhões de hectares plantados, praticamente 35 milhões foi daquele grão. Na sequência histórica, a soja, na safra 2016/2017, ocupou uma área de 33,89 milhões de hectares e uma produção de 113,92 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 3.362 kg por hectare (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2019).

De olho na expansão do mercado internacional, o país se prepara para alcançar números ainda mais surpreendentes. O estudo “Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo”, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, aponta as tendências que permitirão identificar trajetórias possíveis e estruturar visões de futuro do agronegócio no contexto mundial para que o país continue crescendo e conquistando novos mercados. As projeções foram

realizadas para 29 produtos do agronegócio, incluindo, claro, a soja, e contou com a colaboração do setor produtivo e de instituições públicas e privadas vinculadas à agropecuária nacional (BRASIL, 2018).

A meta do Governo brasileiro é alcançar no período de 2027/28 uma safra de grãos por volta de 301,8 milhões de toneladas, o que significa um acréscimo de 29,8% sobre a atual safra. No tocante à soja, a estimativa é que em dez anos (2017/18-2027/28) a área plantada aumente, passando de 35.100 para 45.084 milhões de hectares (BRASIL, 2018).

Mas nem só de clima favorável e de terras abundantes se sustenta o protagonismo do Brasil no quesito produtividade agrícola. Aliado a esses fatores há uma crescente necessidade de trabalho de tecnologia de ponta focado também no controle de pragas, plantas daninhas, identificação de doenças com adoção de medidas de controle e manuseio de fungicidas e outros produtos.

Devido ao aparecimento de pragas cada vez mais resistentes aos agrotóxicos comumente aplicados são utilizadas concentrações maiores, o que agrava os danos ao meio ambiente e aos seres humanos que possuem contato com essa substância.

No Brasil, o consumo de agrotóxicos cresceu disparadamente nas últimas décadas, transformando o país em um dos líderes mundiais no consumo de agrotóxicos. O uso dessa substância apresenta vantagens tentadoras ao agricultor, como fácil aplicação e alta mortalidade de pragas. No entanto, foram observados muitos resultados negativos, como extermínio dos inimigos naturais de pragas (DE MENDONÇA NETO; BURLE; FIGUEIREDO, 2019), intoxicações agudas e crônicas de agricultores e de consumidores (CASSAL et al., 2014), contaminação da água e alteração da biodiversidade local (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). As consequências negativas do agrotóxico fizeram crescer a produção de produtos biológicos para controle de pragas e doenças agrícolas, com um aumento de mais de 70% no último ano no Brasil (BRASIL, 2019).

### **3.1.1 Controle biológico**

O controle biológico consiste no uso de organismos vivos ou modificados geneticamente para controle de pragas, doenças e outros agentes nocivos para a

agricultura (BRASIL, 2019), e nos dias atuais é um dos componentes do programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), juntamente com outras medidas. Esse é um método utilizado desde a antiguidade (GALLO et al., 2002), e, nos dias de hoje, podemos dar como exemplo o uso de joaninha (*Rodolia cardinalis*) para controle do pulgão-branco-dos-citros (*Icerya purchasi*) (CAUSTON et al., 2009). No Brasil, o maior destaque é o emprego de *Metarhizium anisopliae* para controle da cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) (FARIA, 2001).

O controle biológico também pode ser realizado a partir de organismos entomopatogênicos, como fungos, bactérias e vírus. Podemos citar como exemplo a bactéria *Bacillus thuringiensis* para o controle de lagartas e pernilongos; e o vírus *Baculovirus* para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (GALLO et al., 2002).

Atualmente há uma forte pressão mundial para usar produtos menos agressivos ao ambiente e à saúde humana, o que pode ser percebido pelo aumento da presença de mercados de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou com selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente (BETTIOL, 2008). O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura, tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores e a resistência de patógenos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). O controle biológico, por outro lado, pode tanto aproveitar o predadorismo natural quanto realizar a introdução de um agente (BETTIOL, 2008), o que traz inúmeros benefícios pois protege a biodiversidade, não causa desequilíbrio ecológico por ser específico, não deixa resíduos, diminui perda da plantação e a dependência de agrotóxicos (MORANDI; BETTIOL, 2009). Por outro lado, devido à sua especificidade, necessita de uma grande variedade de espécies para combater os diversos tipos de pragas (GALLO et al., 2002). Além disso, tal tratamento exige conhecimento de tecnologia e pode ser de difícil acesso e incorporação por agricultores menos instruídos.

Produtos a base de *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria entomopatogênica capaz de causar morte de algumas espécies de Lepidópteras, consiste em uma ferramenta que busca reduzir os efeitos negativos de pesticidas químicos (COPPING; MENN, 2000), além de diminuir os custos que os agricultores têm com a compra de pesticidas comerciais. Como ponto positivo, pode-se destacar a baixa

produção de resíduos, baixa toxicidade para mamíferos e alta especificidade e letalidade nos organismos de interesse (CLOYD, 2004).

### 3.1.2 *Bacillus thuringiensis* e proteínas *Cry*

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva formadora de esporos que pertencente ao gênero *Bacillus*, conhecida pela produção de proteínas formadoras de cristal, chamadas de  $\delta$ -endotoxinas (BRAVO et al., 2007). Essas toxinas, de nome *Cry* e *Cyt*, possuem atividade inseticida, sendo *Cyt* com atividade citolítica *in vitro* e com maior especificidade *in vivo* às espécies da ordem Diptera (De MAGD et al., 2003; BUTKO et al., 2003).

Além das proteínas *Cry* e *Cyt* são produzidos outros fatores de virulência que também possuem atividade inseticida, como as toxinas  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas (HÖFTE WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998; KATAYAMA et al., 2004). Esses fatores podem diminuir a toxicidade das  $\delta$ -endotoxinas por acarretar em uma competição pelos sítios de ligação. Já os esporos podem contribuir com a patogenicidade pois possuem ação sinérgica com as proteínas *Cry* (JOHNSON; MCGAUGHEY, 1996).

Ao ser ingerida pelo inseto suscetível, as proteínas *Cry* (Figura 1) são solubilizadas no intestino da larva devido ao pH alcalino, sendo liberadas como pró-toxinas.

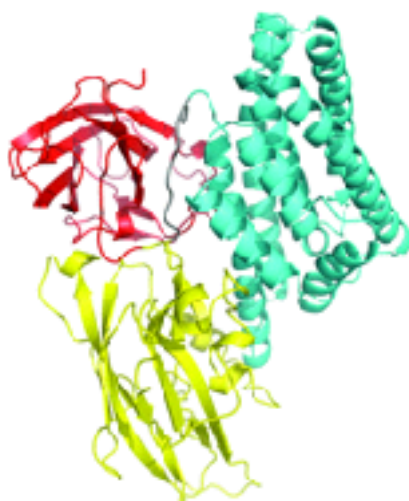
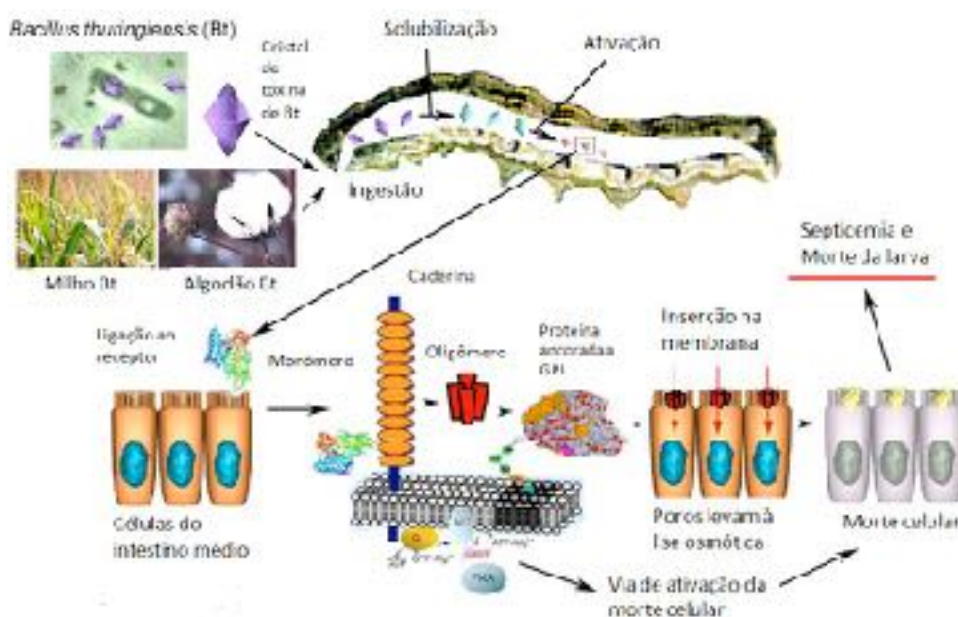


FIGURA 1. ESTRUTURA DA PROTEÍNA CRY1AA (BUSBY, JASON, 2014).

Estas serão ativadas por proteases, se transformarão em toxinas ativas que se ligarão a receptores específicos das microvilosidades intestinais desse inseto, formando poros na membrana e causando destruição do epitélio intestinal (BRAVO et al., 2007; KNOWLES, 1994; HOFFMANN et al., 1988) (Figura 2).



**FIGURA 2. ESQUEMA DO MODO DE AÇÃO DE TOXINAS *Cry* DE *B. thuringiensis* EM LARVAS. ADAPTADO DE [HTTP://WEB.UTK.EDU/~JURAT/](http://web.utk.edu/~jurat/).**

A partir de estudos *in vivo* envolvendo seres como mamíferos, plantas e outros invertebrados, foi observado que a proteína *Cry*, mesmo em altas concentrações, não possui atividade danosa à esses organismos (SHIMADA et al., 2003). Assim, devido ao fato de ter alta especificidade e causar menos danos ao meio ambiente (KRIEG; LANGENBRUCH, 1981), o *B. thuringiensis* é indicado como um agente favorável e seguro para o controle de insetos (NEXTER et al., 2002), podendo levar à redução do uso excessivo de agrotóxicos.

A toxicidade dessa proteína foi observada em insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera (BRAVO et al., 2007; KNOWLES, 1994), e, devido a isso, as proteínas *Cry* vêm sendo utilizadas como inseticidas biológicos com sucesso há muitos anos (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

### 3.1.3 Produção "on farm"

A produção "on farm" de bioinseticidas consiste na produção, em propriedade rural, de defensivos agrícolas formulados a partir de organismos biológicos, para uso e aplicação no controle de pragas da lavoura.

O crescimento da produção "on farm" se deu devido ao alto custo de defensivos agrícolas vendidos comercialmente e como uma alternativa ao uso de agrotóxicos químicos, buscando redução dos danos causados ao meio ambiente e à saúde humana.

Os perigos trazidos pelos contaminantes são mais evidentes na produção caseira uma vez que normalmente é realizada sem as condições mínimas de assepsia, com utilização de produtos não esterilizados e fermentadores inadequados (VALICENTE et al., 2018). A contaminação pode ser prejudicial não só para a lavoura, mas principalmente aos seres humanos que estarão em contato com esse meio contaminado.

A fermentação geralmente é realizada em caixas d'água, com utilização de água não esterilizada, sem controle de temperatura e conhecimento taxonômico para identificação e contagem de colônias. Devido ao fato do meio ser rico em nutrientes que favorecem o crescimento microbiano, os contaminantes podem ainda se multiplicar mais rápido que os micro-organismos de interesse. Além disso, em condições inapropriadas de produção, o agente biológico pode apresentar baixa concentração dos princípios ativos que controlam os insetos (VALICENTE, 2019; ABCBio, 2019).

Amostras de biopesticidas produzidos em propriedades rurais no Mato Grosso foram analisadas e constatou-se a presença de contaminação por diferentes espécies de bactérias. Dentre 50 colônias que cresceram nos biopesticidas com produção "on farm", apenas três eram realmente a bactéria de interesse para controle biológico. Foi também observado o crescimento de bactérias patogênicas, como *Enterococcus*, *Microbacterium* e *Bacillus cereus* (VALICENTE et al., 2018; VALICENTE et al., 2019).



### 3.2 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

A avaliação da qualidade microbiológica de produtos é realizada a partir de uma série de testes que buscam garantir a segurança, eficácia e aceitabilidade de um produto. A contaminação por micro-organismos, patógenos ou não, pode gerar um produto inadequado ao consumo humano. Devido à isso, são estipulados limites máximos de presença de micro-organismos, com metodologia descrita em estatutos oficiais, farmacopeias, normas regulamentadoras e agências de controle sanitário (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

A contaminação microbiana de um produto pode acarretar em alterações nas suas propriedades físicas e químicas, e conseqüentemente apresentar risco de infecção para o homem e o meio ambiente. A instabilidade da formulação leva à alteração de características físicas e químicas, podendo causar inativação de princípios ativos ou excipientes, alteração da aparência e degradação do produto. Desta forma, produtos não estéreis devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana, a fim de evitar e prevenir riscos relacionados à sua qualidade e segurança (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

Os micro-organismos capazes de se proliferar e contaminar o produto devem estar dentro dos limites especificados, levando em consideração qual a finalidade e condições de uso desse produto, o público alvo, a frequência e tempo de exposição ao produto e as características dos micro-organismos contaminantes (BRASIL, 2010; BRASIL, 1976; PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

A garantia da qualidade e o controle de fabricação previstos nas Boas Práticas de Fabricação (BPFs) devem garantir que o produto cumpra as especificações determinadas (BRASIL, 2010). Para a realização do teste em produtos não estéreis, devem ser considerados os limites microbianos aceitáveis de acordo com o tipo de contaminação mais provável nas diferentes categorias. Produtos com grande teor de água devem ser testados com uma maior frequência, tendo em vista que esse tipo de meio favorece maior crescimento de micro-organismos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000). Na tabela 1 está descrito o limite de micro-organismos viáveis, expresso em UFC/mL aceito em produtos contendo água não potável segundo Monnerat et al. 2018.

Tabela 1 - Limite microbiano aceito em produtos contendo água não potável expresso em UFC/mL

Micro-organismo	Micro-organismos viáveis
<i>Salmonella</i>	0
Coliformes termotolerantes	≤ 500
<i>Escherichia coli</i>	≤ 400
Enterococos	≤ 50
Estreptococos	0
Fungos	0

Fonte: Monnerat et al. (2018)

### 3.2.1 Principais fontes de contaminação microbiana

Durante a produção de produtos não-estéreis, diversos fatores contribuem para a contaminação microbiana. Dessa maneira, é necessária uma avaliação crítica de toda a cadeia produtiva, buscando prevenir e evitar condições que favoreçam a contaminação e proliferação de micro-organismos. Além do risco de causar doenças em humanos, a administração de produtos contaminados pode agravar quadros clínicos de pacientes já debilitados ou imunocomprometidos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000). É fundamental acompanhar as diferentes etapas produtivas e conhecer as fontes e mecanismos responsáveis pela contaminação, tendo em vista que o processo de produção exerce grande influência sobre os níveis de contaminação microbiana do produto (BUGNO; BUZZO; PEREIRA, 2003). A contaminação pode originar-se das matérias-primas utilizadas, ser introduzida durante o processo produtivo ou proveniente de má estocagem e uso do produto. Dentre as principais fontes de contaminação, pode-se citar contaminação proveniente do ar, materiais de acondicionamento e embalagem, equipamentos e utensílios de produção, matérias-primas, teor de água e contaminação direta pelos manipuladores do produto (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000).

## 3.2.2 Micro-organismos

### 3.2.2.1 Bactérias

Bactérias são organismos unicelulares que possuem 3 formas básicas: esférica (coco), bastão (bacilo) e espiralada (MADIGAN, 2016).

Possuem parede celular com estrutura completa e semi-rígida, que circunda a membrana plasmática e previne a ruptura da célula em alguns casos. Devido às diferenças na composição da parede celular das bactérias, elas podem ser divididas em gram positivas e gram negativas (MADIGAN, 2016; TORTORA, 2012).

As bactérias gram positivas são formadas por múltiplas camadas de peptidoglicano, ácidos teicóicos e fosfato. Já as bactérias gram negativas possuem uma ou poucas camadas de peptidoglicano, com ligações a lipoproteínas. Devido à pouca quantidade de peptidoglicano na membrana, ela fica mais suscetível ao rompimento mecânico. Possui carga negativa forte, o que evita fagocitose, e são consideradas mais nocivas ao ser humano por estimularem a resposta imunitária (MADIGAN, 2016; TORTORA, 2012).

#### 3.2.2.1.1 Bactérias patogênicas

##### 3.2.2.1.1.1 *Salmonella*

*Salmonella* é um gênero de bactérias gram negativas da família *Enterobacteriaceae*. Cepas patogênicas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* são conhecidas por causar gastroenterite, e de *Salmonella typhi* por causar febre tifóide (CHRISTENSON, 2013; SHEFF B., 2002).

A febre tifóide, comum em áreas com baixo saneamento, é caracterizada por febre, náusea, vômito, tosse, dor de cabeça, diarreia, rash cutâneo róseo e dor abdominal. Ela também pode causar danos fatais no trato gastrointestinal e sistema nervoso (DOUGAN; BAKER, 2014). É extremamente importante o início do tratamento com uso de antibióticos assim que a doença for diagnosticada. Já existem casos de cepas de *Salmonella* multirresistentes, principalmente aos antibióticos de primeira escolha (THRELFALL, 2002), como *Salmonella typhi*

resistentes às fluoroquinolonas, antibióticos de primeira escolha para o tratamento de febre tifóide (CUYPERS, 2018).

*S. typhi* se adere às células epiteliais sobre Placas de Peyer (agregados de nódulos linfáticos que fazem parte do tecido linfóide associado ao intestino), permitindo a penetração através da mucosa intestinal. A fagocitose por macrófagos e o fluxo devido a drenagem dos linfonodos resulta em bacteremia, sepse, choque séptico e disseminação pelo organismo (CHRISTENSON, 2013).

As infecções por *Salmonella* costumam ser resultado da ingestão de água ou alimentos não processados apropriadamente, contaminados com fezes de portadores assintomáticos ou com a doença ativa. Moscas também podem disseminar o micro-organismo de fezes para alimentos (SHEFF B., 2002).

#### **3.2.2.1.1.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é um bacilo gram negativo aeróbio pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É a bactéria comensal da microbiota natural do intestino grosso mais numerosa, mas possui cepas consideradas patogênicas que são responsáveis por doenças como infecção do trato urinário, pneumonia, diarreia, meningite e demais infecções intestinais (SILVA, 1999).

As cepas patogênicas de *E. coli* que produzem endotoxinas potentes podem causar diarreias moderadas a severas, colite hemorrágica grave e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em todas as faixas etárias, podendo levar à morte se não for realizado o tratamento correto (ZIESE et al., 1996). A SHU é uma doença caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e lesão renal aguda (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE).

O efeito de uma cepa depende de seu sorotipo. O mais grave é o enterohemorrágico (EHEC), em que a cepa O157:H7 é a mais reconhecida por causar SHU em idosos e crianças menores de cinco anos. *E. coli* O157:H7 é considerada extremamente patogênica por produzir uma toxina chamada *Shiga toxin*, nome dado devido à semelhança com a toxina produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae*. Ao ser liberada no intestino grosso, a toxina Shiga causa inibição da síntese de células do hospedeiro, causando diarreia branda que pode evoluir para diarreia sanguinolenta (TRABULSI, 2008).

A infecção por *E. coli* se dá devido ao consumo de água ou alimentos contaminados com fezes de humanos ou animais infectados. Aproximadamente metade das infecções por *E. coli* produtora de proteína Shiga são ocasionadas pelo consumo de carne contaminada crua ou mal cozida (MADIGAN, 2016).

As bactérias foram classificadas de acordo com seu sorotipo e suas características de virulência:

1. EPEC (*E.coli* Enteropatogênica): causa diarreia aquosa não sanguinolenta em crianças (MINAGAWA, 2007), febre, náusea e vômito. Seus fatores de virulência incluem adesão ao intestino devido à presença de fímbria, intimina, que seleciona os sítios de aderência, e proteínas que podem resultar na apoptose de células epiteliais do intestino e disfunções mitocondriais (TRABULSI, 2008; KAPER, 2004; OCHOA, 2008).
2. ETEC (*E.coli* Enterotoxinogênica): comumente ingerida a partir de comida mal cozida ou água contaminada com fezes infectadas. Atinge principalmente o intestino delgado, se aderindo fortemente à mucosa devido à presença de fímbrias em sua estrutura, evitando que seja arrastada pela diarreia volumosa (ROCHA, 2008; CROXEN; FINLAY, 2009). Produz toxinas que agem nas células da mucosa que podem promover a morte do enterócito, gerando uma resposta inflamatória acompanhada de necrose e ulceração no intestino grosso (CLARKE, 2001).
3. EIEC (*E.coli* Enteroinvasora): causa diarreia aquosa seguida em alguns doentes de diarreia com sangue e muco. São invasivas e destrutivas da mucosa intestinal, causando úlceras e inflamação (MINAGAWA, 2007).
4. EHEC (*E.coli* Enterohemorrágica): causa diarreia aquosa que pode progredir para diarreia hemorrágica e síndrome hemolítico-urémico. Têm fímbrias aderentes e toxicidade devido à produção da toxina Shiga. Pode provocar anemia, trombocitopenia e insuficiência renal aguda (JANSEN, 2011).
5. DAEC (*E. coli* que adere difusamente): conhecida por causar diarreia aquosa em crianças pequenas. É uma categoria de *E. coli* ainda não muito estudada, logo pouco se sabe sobre sua patogênese e mecanismo de ação (MINAGAWA, 2007).
6. EAEC (*E.coli* Enteroagregativa): causa diarreia aquosa ou hemorrágica persistente em humanos e animais. As bactérias se agregam no cólon

humano e estimulam a secreção de muco, formando uma espécie de biofilme. Produz toxinas, levando a lesões intestinais, e costuma atingir principalmente crianças menores de 2 anos (WEINTRAUB, 2007; MINAGAWA, 2007).

7. UPEC (*E. coli* Uropatogênica): causa frequentemente infecções do trato urinário (ITU) (SILVA, 2012). Os principais fatores de virulência conhecidos e observados em UPEC incluem adesinas, hemolisinas, citotoxinas e proteínas de captação de ferro ou sideróforos (STAMM, 2006).
8. SEPEC (*E. coli* associada à sepse humana): causa bacteremia e sepse. Não possui pesquisas detalhando seu mecanismo de ação.
9. APEC (*E. coli* patogênica para aves)
10. NMEC (*E. coli* meningite neo natal)

### 3.2.2.1.1.3 Estreptococo

São bactérias coco gram positivas, anaeróbias facultativas e produtoras de ácido láctico. Fazem parte da microbiota normal da boca, pele, intestino e trato respiratório superior. São considerados patógenos intra e extra celulares por causarem infecções invasivas e também colonizarem diferentes tecidos, causando infecções extracelulares (LARRY, 2017; RUOFF, 2007).

Podem ser divididas entre alfa, beta e gama hemolíticas, sendo diferenciados por sua capacidade de causar lise em hemácias no meio ágar sangue. Estreptococos alfa-hemolíticos realizam hemólise incompleta, beta-hemolíticos realizam hemólise completa e gama-hemolíticos são não hemolíticos (OPLUSTILL, 2004; RUOFF, 2007).

A principal espécie causadora de doenças é *Streptococcus pneumoniae*, também conhecida como pneumococo, um diplococo gram positivo alfa-hemolítico que faz parte da flora do trato respiratório humano. É o agente causador de doenças como pneumonia pneumocócica, sepse, meningite e otite média (BARNETT et al., 2015).

*Streptococcus pyogenes*, um estreptococo beta-hemolítico do grupo A (GABHS), é uma cepa conhecida por ser extremamente patogênica. Causa doenças como faringite, fasciite necrosante, síndrome do choque tóxico estreptocócico, escarlatina e infecções cutâneas, como impetigo, erisipela e celulite. *S. pyogenes*

secreta fatores de virulência como adesinas, invasinas e proteínas M para aderir e invadir as células hospedeiras, assim como para escapar das células do sistema imunitário do hospedeiro. A proteína M é a principal proteína de superfície dos estreptococos, que confere ao organismo resistência à fagocitose (CHHATWAL; GRAHAM, 2017).

#### **3.2.2.1.1.4 Enterococo**

Enterococos são cocos gram positivos agrupados em cadeia, anaeróbios facultativos, presentes na flora intestinal normal de humanos e animais. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são cepas patogênicas que causam uma variedade de infecções, incluindo endocardite, infecção do trato urinário, infecção intra-abdominal (FOX, 2016), prostatite, celulite e infecção em feridas, além de bacteremia (FACKLAM, 2007). Nas últimas décadas, a resistência a múltiplos antimicrobianos aumentou rapidamente, especialmente no caso de *E. faecium* e *E. faecalis*, que possuem resistência a Vancomicina e antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (CETINKAYA, 2000; MUNDY, 2000).

#### **3.2.2.1.1.5 Coliformes termotolerantes**

Coliformes termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, e faz parte da família *Enterobacteriaceae*. São bacilos gram negativos, com capacidade de se reproduzir e fermentar açúcar e lactose a 45 °C, produzindo gás e ácidos. Faz parte desse subgrupo enterobactérias de origem fecal, como *E. coli*, e de origem não fecal, como cepas de *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (FOPPEN; SCHIJVEN, 2006; PACHEPSKY et al., 2014; MAURER et al., 2015)

Em geral, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* provocam uma grande variedade de infecções, incluindo bacteriemia, infecções de catéter intravascular, no trato respiratório (pneumonia) ou urinário (cistite e pielonefrite), podendo progredir para abscesso pulmonar, empiema, bacteremia e sepse (FERTAS-AISSANI et al., 2013; GRIMONT; GRIMONT, 2015; 1; RISTUCCIA; CUNHA, 1985).

A pneumonia por *Klebsiella* apresenta febre alta e hemoptise, com formação de expectoração com coloração de geléia de groselha ou marrom escura. (Departament Of Health & Hospitals, 2010). As infecções por *Klebsiella* são observadas em quase todos os locais do corpo, embora predominem no trato urinário e respiratório. É um patógeno comum adquirido em hospital, causando infecções do trato urinário, pneumonia nosocomial, infecções intra abdominais e bacteremia (FERTAS-AISSANI et al., 2013)

*Serratia* são bactérias gram negativas, anaeróbias facultativas. *Serratia marcescens* é um patógeno oportunista comum em pacientes humanos hospitalizados, possui maior afinidade com o trato urinário, mas também pode causar sepse (DODSON, 1968) e infecção nosocomial (DONNENBERG, 2015). Já existem casos de cepas de *S. marcescens* com resistência à antibióticos, como cefalotina, colistina e polimixina (GRIMONT; GRIMONT, 2015).

*Enterobacter* é um gênero presente naturalmente no trato gastrointestinal de animais e seres humanos. Raramente causa infecções primárias, mas, quando apresenta atividade patogênica, tem a capacidade de atingir qualquer tecido corporal. As principais cepas patogênicas causadoras de doenças nosocomiais são *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter agglomerans*. *Enterobacter* tem sido associado à sepse grave em ambiente hospitalar (RISTUCCIA; CUNHA, 1985).

### **3.2.2.2 Bolores e leveduras**

Fungos são organismos eucariotos, heterotróficos com nutrição por absorção, e produtores de esporos. Podem ser filamentosos ou leveduriformes, adquirindo características multicelulares e unicelulares, respectivamente. Sua parede celular é composta por multi-camadas, sendo 90% polissacarídeos e 10% proteínas e glicoproteínas, e possui como função dar forma, rigidez e proteção contra variações de pressão osmótica. Pode ser formada por quitina, celulose ou ambos. Fazem reprodução assexuada, vegetativa e por esporos, e sexuada, por meio da fusão de corpos diferenciados (MADIGAN, 2016; TORTORA, 2012).

Os fungos fitopatógenos são conhecidos por causarem doenças em plantas, podendo afetar gravemente plantações, além de possuir alto poder de propagação



devido à formação de esporos. A sobrevivência e atividade da maioria dos fungos fitopatogênicos depende das condições climáticas do ambiente, como temperatura, umidade e presença de água (MICHEREFF, 2001).

Esses organismos causam doenças por meio de três mecanismos principais: respostas imunes inapropriadas, produção de toxinas e micoses (MICHEREFF, 2001). Por isso, são a principal preocupação relativa à fitossanidade, tendo em vista que alguns desses micro-organismos apresentam potencial produção de micotoxinas em diversos tipos de locais, como no ambiente de armazenamento e campo, podendo se tornar um problema à saúde pública (FREITAS-SILVA et al., 2013).

Podem causar doenças sérias ao ser humano, como micose superficial, cutânea, subcutânea, sistêmica e oportunistas. Variam de diversas condições, desde doenças relativamente simples e de fácil cura, como o pé de atleta, a doenças mais sérias, sistêmicas e com risco de vida, como a histoplasmose. Imunocomprometidos são os mais afetados pelas espécies patogênicas (MADIGAN, 2016).

### **3.2.2.2.1 Fungos patogênicos**

#### **3.2.2.2.1.1 Aspergillus**

*Aspergillus spp.* são fungos saprófitos que geralmente crescem no material em decomposição de plantas. As cepas patogênicas mais conhecidas são *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (DE AMORIM, 2004). São causadores de aspergilose pulmonar, que ocorre a partir da inalação de conídios, comumente presente no ambiente. Os pulmões são os principais locais de colonização (STEVENS et al., 2000), onde o conídio se aloja nos alvéolos, causa inflamação dos seios paranasais e da árvore brônquica. Os sintomas comuns são tosse, hemoptise (RICHARDSON, M. D.; JOHNSON, E. M., 2000), dispnéia, emagrecimento, fadiga, dor torácica e febre (STEVENS, 2001). A temperatura corporal, capacidade de adesão ao endotélio e epitélio, invasão dos vasos sanguíneos e produção de toxinas são os principais fatores de virulência que permitem que ocorra a infecção (DE AMORIM, 2004).

Outras doenças causadas por *Aspergillus spp.* são: alveolite alérgica, sinusopatia, lesões cerebrais, endoftalmite, lesões cutâneas e intoxicação crônica devido à micotoxinas (DE AMORIM, 2004).

### **3.2.2.2.1.2 Candida**

Gênero de leveduras comensais que habitam o trato gastro intestinal e algumas vezes a pele. A candidíase, doença principalmente causada pela alta proliferação de *Candida albicans*, é caracterizada por lesões mucocutâneas, fungemia e, algumas vezes, infecção focal de múltiplos locais. Pode se desenvolver nas unhas, pele, dobras abdominais e glúteas, orofaringe e região vulvovaginal. Os sintomas dependem do local da infecção e incluem disfagia, lesões cutâneas e de mucosa, cegueira, prurido, queimação e corrimento vaginais, febre, choque, oligúria, insuficiência renal e coagulação intravascular disseminada (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; SILVA et al., 2012).

*Candida glabrata*, outra importante cepa com capacidade patogênica, está cada vez mais envolvidas em casos de fungemia, infecção do trato urinário (ITU) e doenças focais (SILVA et al., 2012).

Entre seus fatores de virulência estão a capacidade de aderência e formação de biofilme no tecido do hospedeiro, habilidade de escapar de células do sistema imunitário e produção de enzimas danosas ao tecido (SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 *Bacillus thuringiensis*: cultivo da estirpe, microscopia e pureza**

Neste experimento foi selecionada a estirpe padrão S1450 para produção de bioinseticidas por ser referência no combate a Lepidópteras e ter alta toxicidade conhecida contra esses insetos (NEXTER, 2002). A estirpe pertence à Coleção de Bactérias de Invertebrados do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Cenargen.

A estirpe S1450 foi inoculada em Meio Embrapa Líquido (caldo nutritivo 8 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g/L; extrato de levedura 1 g/L; solução de sais minerais 10 mL/L, pH 7). O cultivo foi incubado em agitação por 72 horas a 200 rpm e 30 °C, até que fosse possível a observação de esporos e cristais em microscópio. Com o auxílio de uma alça estéril descartável, 1  $\mu\text{L}$  do inóculo contendo *Bacillus thuringiensis* foi semeado em placa de Petri contendo meio Embrapa sólido e avaliado após 48 horas para verificar possível presença de contaminantes na amostra.

O cultivo de *Bacillus thuringiensis* anteriormente inoculado foi vertido em tubos de centrifuga previamente esterilizados. Nas condições de 4 °C e 10.000 rpm, a amostra foi centrifugada por 30 minutos em centrífuga da marca Rotanta 460R.

O sobrenadante foi retirado e o "pellet" formado foi ressuspendido com água destilada esterilizada. A amostra final foi homogeneizada e distribuída em tubos de vidro esterilizados, que foram para o congelador, onde ficaram por aproximadamente 24 horas. Depois disso, os tubos foram colocados no liofilizador, da marca Christ, onde ficou por 4 dias até a secagem da amostra.

O material liofilizado contendo *Bacillus thuringiensis* S1450 foi inoculado em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Embrapa Líquido previamente autoclavado. A solução foi incubada em agitador a 200 rpm, 30 °C por 72 horas. Após as 72 horas foi observado a partir de microscópio de contraste de fases a presença de esporos e cristais da estirpe crescida.

#### **4.2 Kit proposto para controle de qualidade microbiológico em produção "on farm" de bioinseticidas**

Foi confeccionado um kit no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) tendo como base o kit proposto comercialmente. Duas diferenciações em comparação ao kit comercial se destacam: o meio ágar nutritivo foi incorporado na placa de 6 poços e o meio Sabouraud + cloranfenicol foi empregado nas placas 49x13 mm devido às diferenças de temperatura para incubação. O kit foi composto por duas placas de 6 poços contendo duplicata dos meios ágar Verde Brilhante, ágar MacConkey, ágar confirmatório para Enterococos, ágar seletivo para Estreptococos, ágar nutritivo e ágar Bile Vermelho Violeta Lactose; duas placas 49x13 mm de ágar Sabouraud + cloranfenicol; 3 tubos de centrifuga de 15 mL contendo 4,5 mL de

solução salina 0,85% para diluição da amostra; 7 alças de Drigalski para sementeira do meio (Figura 3).



**FIGURA 3. PLACAS DE 6 POÇOS DO KIT FEITO NO LBE CONTENDO OS MEIOS SELETIVOS UTILIZADOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO**

Na Tabela 2 estão detalhados os meios seletivos presentes no kit produzido no laboratório, juntamente com os micro-organismos analisados definidos pelos fabricantes.

Tabela 2 - Meios de cultura e seus respectivos contaminantes avaliados no controle de qualidade microbiológico.

Micro-organismos	Meios presentes no kit
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ágar nutritivo
Coliformes termotolerantes	Ágar Bile Vermelho Violeta Lactose <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>
<i>E. coli</i>	Ágar MacConkey <i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>

Tabela 2 - Meios de cultura e seus respectivos contaminantes avaliados no controle de qualidade microbiológico.

Micro-organismos	Meios presentes no kit
Enterococos	<b>Ágar confirmatório para Enterococos</b> <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
Estreptococos	<b>Ágar seletivo para Estreptococos</b> <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Salmonella	<b>Ágar Verde Brilhante</b> <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella typhi</i>
Fungos	<b>Ágar Sabouraud + cloranfenicol</b> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

#### Meio Ágar Sabouraud 4% com cloranfenicol

Dextrose	40 g/L
Digestão de Tecido Animal	5 g/L
Digestão Pancreática de Caseína	5 g/L
Ágar	15 g/L
Cloranfenicol	0,25g/L
pH final	5,6 ± 0,2

Meio composto por nutrientes que favorecem o crescimento de diversas leveduras e fungos filamentosos. É utilizado para cultivo de espécies de *Candida* e fungos filamentosos, particularmente associados a infecções superficiais. O cloranfenicol foi adicionado para inibir o crescimento de bactérias, com o objetivo de avaliar somente o crescimento de fungos.

**Meio Ágar MacConkey**

Digestão Pancreática de Gelatina	17 g/L
Peptona	3 g/L
Lactose	10 g/L
Sais Biliares nº 3	1,5 g/L
Cloreto de Sódio	5 g/L
Vermelho Neutro	0,03 g/L
Cristal Violeta	0,001 g/L
Ágar	15 g/L
pH final	7,1 ± 0,2

Meio utilizado para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos gram negativos, recomendado para isolamento e identificação de *Escherichia coli* em produtos não estéreis.

As bactérias fermentadoras de lactose produzem colônias vermelhas ou rosadas. Outros bastonetes gram negativos, como *Pseudomonas sp.* e *Aeromonas sp.* também apresentam crescimento, formando colônias cuja coloração varia de incolor até verde café.

**Meio Ágar seletivo para Streptococos**

Caseína enzimática hidrolisada	15 g/L
Digestão Papaica de Farelo de Soja	5 g/L
Dextrose	5 g/L
Cloreto de Sódio	4 g/L
Citrato de Sódio	1 g/L
Sulfito de Sódio	0,2 g/L
L-Cisteína	0,2 g/L
Azida Sódica	0,2 g/L
Cristal violeta	0,0002 g/L
Agar	15 g/L
pH final	7.4±0.2

Meio recomendado para isolamento seletivo de *Streptococos* de diversos materiais especialmente aqueles que estão fortemente contaminados microbiologicamente. O crescimento de espécies de coliformes, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Bacillus* é significativamente suprimido nesse meio. No entanto, algumas estirpes de *Staphylococos* e *Pneumococos* podem crescer. A presença de colônias pode indicar contaminação por *Streptococcus pyogenes* ou *Enterococcus faecalis*.

### Meio Ágar confirmatório para Enterococos

Caseína enzimática hidrolisada	5g/L
Dextrose	5g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
Azida de sódio	0,4 g/L
Azul de Metileno	0,01 g/L
Ágar	15 g/L
pH final	$8 \pm 0.2$

Recomendado para confirmação da presença de *Enterococos* em água de diversas fontes. O crescimento de colônias indica contaminação por *Enterococcus faecalis*.

### Meio Ágar Verde Brilhante

Peptona especial	10 g/L
Lactose	10 g/L
Extrato de Levedura	3 g/L
Cloreto de Sódio	5 g/L
Sacarose	10 g/L
Vermelho Fenol	0,08 g/L
Verde Brilhante	0,0125 g/L
Ágar	20 g/L
pH final	$6,9 \pm 0,2$

Meio utilizado para o crescimento de *Salmonella spp*, permitindo o isolamento destes organismos mesmo em materiais fortemente contaminados, como as fezes. As colônias típicas de *Salmonella* possuem aparência branco-rosadas circundadas por um meio vermelho brilhante, enquanto organismos fermentadores de lactose e/ou sacarose, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, formam colônias amarelas-esverdeadas circundadas por uma zona verde-amarelada.

### **Meio Ágar Bile Vermelho Violeta Lactose**

Lactose	10 g/L
Digestivo Enzimático de Tecido Animal	7 g/L
Cloreto de Sódio	5 g/L
Extrato de Levedura	3 g/L
Mistura de Sais Biliares	1,5 g/L
Vermelho Neutro	0,03 g/L
Violeta Cristal	0,002 g/L
Ágar Bacteriológico	15 g/L
pH final	7,4 ± 0,2

Meio utilizado para avaliação do crescimento de *Enterobacteriaceae* em alimentos e produtos lácteos. Esse grupo inclui bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos, e gram-negativos não formadores de esporos. Pode haver crescimento de outros organismos fermentadores de lactose, que possuem aparência roxo avermelhadas com ou sem uma zona de precipitados ao redor da colônia. As colônias de organismos não fermentadores de lactose e cocos gram positivos são incolores.

### **Meio Ágar nutriente**

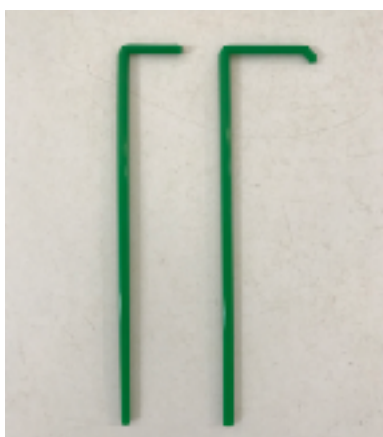
Extrato de Bife	1 g/L
Extrato de Levedura	2 g/L
Peptona	5 g/L
Cloreto de Sódio	5 g/L
Ágar	15 g/L
pH final	6,8 ± 0,2



Meio geral utilizado para o cultivo de organismos que não possuem exigências nutricionais, como os isolados de ar, água, poeira, etc. É adequado para fins de ensino, demonstração e controle de crescimento.

### 4.3 Metodologia

Para avaliação do crescimento de micro-organismos patógenos em meios de crescimento microbiano para produção "on farm" de bioinseticidas utilizando o kit confeccionado no laboratório, foi aplicada a metodologia de rotina utilizada no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) para controle de qualidade microbiológico de amostras, buscando verificar se o crescimento de micro-organismos nos meios seletivos presentes no kit é equivalente ao crescimento segundo a metodologia padrão. Essa metodologia, utilizada para controle microbiológico da água, conforme determinação ANVISA (Brasil, 2010) é utilizada para controle de qualidade microbiológico no LBE, onde foram conduzidos os ensaios. Foram realizadas algumas alterações, como a diminuição da alça de Drigalski (Figura 4) e da quantidade de amostra a ser plaqueada, necessárias devido ao tamanho reduzido da área de superfície das placas de 6 poços.



**FIGURA 4. ALÇA DE DRIGALSKI COM TAMANHO REDUZIDO PARA SEMEAR A AMOSTRA NAS PLACAS DE 6 POÇOS (DIREITA) E COM TAMANHO NORMAL (ESQUERDA)**

Segundo a metodologia, são utilizados os meios Ágar Bile Vermelho Violeta Lactose, Ágar nutritivo, Ágar Verde Brilhante, Ágar MacConkey, Ágar seletivo para *Streptococcus*, Ágar confirmatório para *Enterococcus* e Ágar Sabouraud. A análise do

crescimento é feita a partir de contagem de micro-organismos viáveis pelo método de cultura em superfície e o resultado foi expresso em UFC/mL. O limite microbiano utilizado como referência para o crescimento de micro-organismos no kit foi estabelecido anteriormente como visto na Tabela 1. Considerando a diluição e o volume da amostra semeada, o resultado de micro-organismos viáveis, expressos por UFC/mL, foi ajustado para comparação.

O meio de crescimento bacteriano Embrapa líquido previamente esterilizado contendo inoculação de *Bacillus thuringiensis* serviu como controle para a comparação dos resultados.

Foram avaliados os meios de cultura comerciais para multiplicação bacteriana “on farm” das marcas A, B, C e D, cedidos pelas próprias empresas. Amostras de 100 mL de cada meio, preparadas com água destilada não estéril, foram incubadas em erlenmeyers de 250 mL em agitador a 200 rpm, 30 °C por 72 horas. Foi utilizado água não estéril para simular o preparo do meio em condições “on farm”.

Os meios de crescimento bacteriano foram diluídos em solução salina 0,85% até a concentração 1:1000. A partir desta diluição, 15 µL foram plaqueados nos meios seletivos presentes no kit proposto. A alíquota foi semeada pela superfície do ágar com o auxílio de uma alça de Drigalski de tamanho reduzido devido à área dos poços do kit. Foi realizada duplicata para cada amostra. As placas foram incubadas em estufa a  $36 \pm 2$  °C.

Tendo em vista que, de acordo com o fabricante, o meio Ágar confirmatório de *Enterococos* deve ser incubado a uma temperatura de 45 °C, também foi realizado plaqueamento de 100 µL em placas de Petri 90x15mm, em duplicata. O intuito foi verificar possível crescimento bacteriano e compará-lo com o meio incubado a 36 °C (temperatura presente na metodologia para avaliação do kit como um todo).

Após 12 horas de incubação, as amostras foram submetidas à determinação quantitativa de UFC/mL pela técnica de contagem em superfície.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Microscopia e pureza

Após a incubação da S1450, a partir de avaliação em microscópio eletrônico, foi observada grande produção de esporos e cristais (Figura 5).

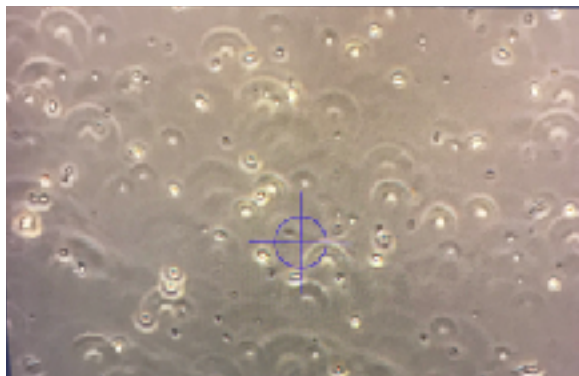


FIGURA 5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE *BACILLUS THURINGIENSIS* S1450

Na análise da pureza da amostra não houve percepção visível de contaminantes (Figura 6).



FIGURA 6. MICRO-ORGANISMOS VIÁVEIS PRESENTES EM PLACA CONTENDO MEIO EMBRAPA SÓLIDO RESULTANTES DE SEMEADURA A PARTIR DO MEIO DE CULTIVO CONTENDO *Bacillus thuringiensis* S1450, UTILIZADO PARA LIOFILIZAÇÃO.

### 5.2 Avaliação da presença de contaminantes

Todos os meios de produção "on farm" comerciais preparados simulando as condições "on farm" apresentaram contaminação, conforme representado na Tabela

4. Nas placas de Petri 90x15 mm só houve avaliação de crescimento no meio seletivo ágar confirmatório para Enterococos para verificar possível crescimento bacteriano a 45 °C e 36 °C.

Tabela 4 - Micro-organismos viáveis, expressos em UFC/mL, presentes na avaliação do crescimento microbiano em meios para produção "on farm" de bioinseticidas

Micro-organismo	Micro-organismos viáveis em placas 90x15mm				Micro-organismos viáveis no kit laboratorial					
	ME Bt	A	B	C	D	ME Bt	A	B	C	D
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	0	0	0	>300.000	0
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	0	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000
Enterococos	0	0	0	>300.000	0	0	0	0	>300.000	0
Estreptococos	-	-	-	-	-	0	>60.000	0	>300.000	>100.000
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000
Coliformes termotolerantes	-	-	-	-	-	0	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000
Fungos	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0

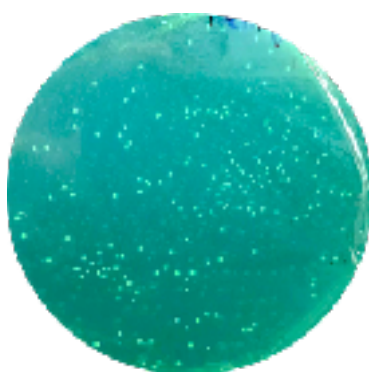
O resultado do plaqueamento das amostras indicou o crescimento de colônias em vários meios seletivos. Foi realizada a contagem de micro-organismos viáveis em superfície e o resultado final foi calculado considerando a diluição utilizada. Na amostra controle, só houve crescimento no ágar nutritivo, indicando presença de *Bacillus thuringiensis* na amostra.

A quantidade de micro-organismos viáveis presentes nos meios seletivos foi muito superior ao indicado no limite microbiano para água não potável. Essas espécies crescidas são conhecidas por serem patogênicas ao ser humano e animais, indicando que as amostras analisadas são impróprias para uso na lavoura pois contaminaria a plantação e traria potencial patogênico aos seres vivos. O crescimento de bactérias patogênicas mais expressivo foi observado no meio C (Figura 7).

Houve crescimento de colônias em todos os meios seletivos presentes no kit preparado no laboratório e no meio Agar confirmatório para Enterococos à 45 °C (Figura 8), indicando possível contaminação por *Salmonella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*.



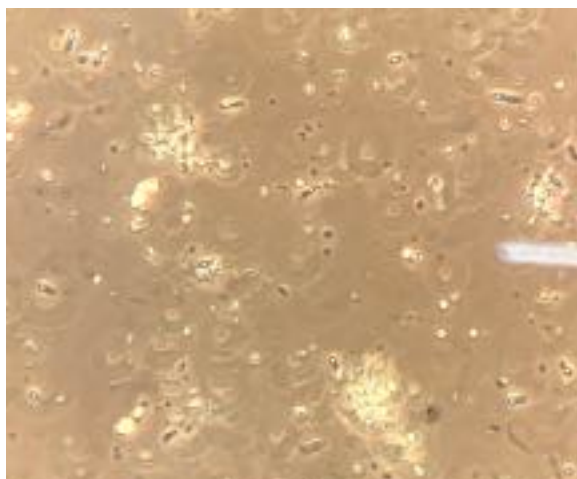
**FIGURA 7. CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NAS PLACAS DE 6 POÇOS CONTENDO AMOSTRA DE MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO BACTERIANO DA MARCA C COM INCUBAÇÃO À 36 °C**



**FIGURA 8. CRESCIMENTO DE UFC EM MEIO SELETIVO CONFIRMATÓRIO PARA ENTEROCOCOS EM PLACA DE PETRI CONTENDO AMOSTRA DE MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO BACTERIANO DA MARCA C COM INCUBAÇÃO À 45 °C**

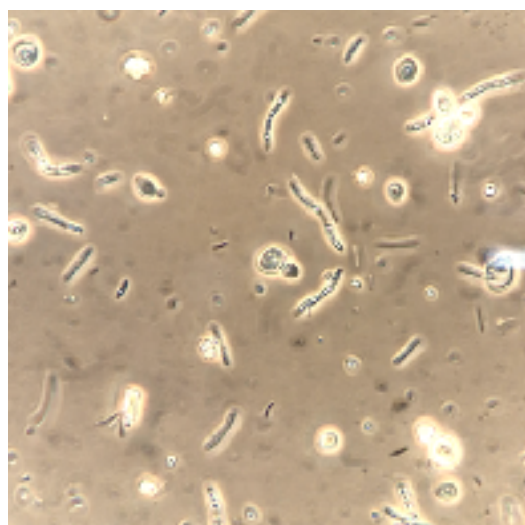
A partir de microscopia realizada nas amostras de meio Embrapa líquido previamente esterilizado com inoculação de *Bacillus thuringiensis* e de meio comercial para multiplicação bacteriana “on farm” da marca C foi possível observar

que na amostra contendo *Bacillus thuringiensis* há presença de esporos e cristais, além de *Bacillus* com característica morfológica parecida com *Bacillus thuringiensis*, sem a presença visível de contaminantes (Figura 9).



**FIGURA 9. MICROSCOPIA DA AMOSTRA CONTENDO MEIO EMBRAPA LÍQUIDO PREVIAMENTE ESTERILIZADO COM INOCULAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis***

Já a amostra do meio C sem inoculação de *Bacillus thuringiensis* apresentou o crescimento de diversos micro-organismos, incluindo *Bacillus* com características morfológicas diferentes de *Bacillus thuringiensis*, e sem produção de cristais (Figura 10).



**FIGURA 10. MICROSCOPIA DA AMOSTRA CONTENDO MEIO DA MARCA C SEM INOCULAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis***

Não houve crescimento de fungos após 12 horas de incubação. Apesar dos fungos precisarem de mais tempo para crescimento no meio ágar Sabouraud, foi seguida a metodologia descrita segundo Monnerat et al. (2018).

Para diminuir o risco de contaminação proveniente do processo de produção “on farm” de bioinseticidas, podem ser tomadas medidas como: esterilização dos materiais utilizados na produção, uso de EPI’s pelos manipuladores do produto e evitar abrir o recipiente onde ocorre a fermentação do produto.

## **6. CONCLUSÃO**

Conforme os resultados obtidos, foi observada contaminação dos meios de crescimento microbiano utilizados para produção “on farm” de bioinseticidas, evidenciado pelo crescimento de bactérias patogênicas nos meios de cultura seletivos utilizados. Dessa forma, esse kit produzido em laboratório poderá auxiliar o produtor a fazer o controle de qualidade dos produtos biológicos produzidos “on farm” na própria fazenda. A ideia é diminuir os gastos que o agricultor teria para realizar o controle de qualidade microbiológico seguindo a metodologia laboratorial.

Futuramente deve ser feito um estudo mais aprofundado sobre a metodologia final a ser aplicada, a fim de realizar alterações pontuais em relação ao uso de pipeta descartável ao invés da micropipeta, verificar o quanto a variação de pH impacta no crescimento dos organismos patogênicos, entre outras variáveis como temperatura e formação de espuma.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, C. C. et al., Monitoring the effects of *Rodolia cardinalis* on *Icerya purchasi* populations on the Galapagos Islands. **Biocontrol**, [s.l.], v. 57, n. 2, p.167-179, 11 dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-011-9429-8>.

ALVIN FOX. Microbiology And Immunology On-line. **Bacteriology - chapter twelve Streptococci groups A, B, D and others Enterococcus faecalis**. 2016. Disponível em: <<https://www.microbiologybook.org/fox/streptococci.htm>>. Acesso em: 22 out. 2019.

Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio). **Quais são os riscos de fazer uma produção on farm de biopesticidas e bioestimulantes?** Disponível em: <<https://www.abcbio.org.br/blog/on-farm/>>. Acesso em: 22 out. 2019.

BARNETT, T. C. et al., Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.1721-1741, 17 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12531>.

BETTIOL, W. et al. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.

BRASIL. Lei 6360. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Brasília, 23 de setembro de 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**. Brasília, 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>>. Acesso em: 22 out. 2019



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do agronegócio. Brasília. Disponível em:<[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/PROJECOES2018\\_FINALIZADA\\_web\\_05092018.pdf/view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/PROJECOES2018_FINALIZADA_web_05092018.pdf/view)>. Acesso em: 10 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Fiocruz; 2010. p. 41,50, 236-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Brasil. Disponível em:<<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/sindrome-hemolitico-uremica>>. Acesso em: 22 out. 2019.

BRAVO, A.; Gill, S.S. & Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **toxicon** 49:423–435. 2007.

Butko, P., Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. **Appl. Environ. Microbiol.** 2003, 69, 2415–2422.

BUGNO, Adriana; BUZZO, Adriana Aparecida; PEREIRA, Tatiana Caldas. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.335-340, set. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322003000300013>.

CASSAL, Vivian Brusius et al. AGROTÓXICOS: UMA REVISÃO DE SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE PÚBLICA. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.10-20, 7 abr. 2014. Universidad Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/2236117012498>.

CAUSTON, C. E.; LINCANGO, M. P.; POULSOM, T. G.a., Feeding range studies of *Rodolia cardinalis* (Mulsant), a candidate biological control agent of *Icerya purchasi* Maskell in the Galápagos islands. **Biological Control**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.315-325, mar. 2004. Elsevier BV.

CETINKAYA Y.; FALK P.; Mayhall C. G.; Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev.** 2000; 13(4):686-707.

CHAATWAL, G. S.; GRAHAM, R., Streptococcal Diseases. **International Encyclopedia Of Public Health**, [s.l.], p.87-97, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803678-5.00434-3>.

CHRISTENSON, J. C., *Salmonella* Infections. **Pediatrics In Review**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.375-383, 1 set. 2013. American Academy of Pediatrics (AAP). <http://dx.doi.org/10.1542/pir.34-9-375>.

CLARKE, S. C., Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? **Diagnostic microbiology and infectious disease.** 2001; 41(3):93-8.

CLOYD, R., Natural indeed: Are natural insecticide safer and better than conventional insecticide? **Illinois Pesticide Review.** 2004. 17: 1-3.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA. Cenário para 2019 é de safra maior de grãos, alta do PIB e do faturamento do agro. Brasília. Disponível em:<<https://www.cnabrazil.org.br/noticias/cenario-para-2019-e-de-safra-maior-de-graos-alta-do-pib-e-do-faturamento-do-agro>>. Acesso em: 22 out. 2019.

CROXEN, Matthew A.; FINLAY, B. Brett. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.26-38, 7 dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2265>.

CUYPERS, W. L. et al., Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. **Microbial Genomics**, [s.l.], v. 4, n. 7, 1 jul. 2018. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000195>.

DE AMORIM, D. S. et al., Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **Pulmão Rj**, v. 13, n. 2, p. 2, 2004.

DONNENBERG, M. S., Enterobacteriaceae. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. Content Repository Only!, 2015. p. 2503-2517. e5.

DOUGAN, G.; BAKER, S., *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.317-336, 8 set. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103739>.

FACKLAM, R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M., Enterococcus In: **Manual of clinical microbiology**. Editor in Chief Murray PR. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007.

FARIA, M. R. de; MAGALHÃES, B. P., O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001

FERTAS-AISSANI, R. El et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.209-216, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004>.

FOPPEN, J.w.a.; SCHIJVEN, J.f.. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. **Water Research**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.401-426, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.018>

FREITAS-SILVA, O.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, E. M. M. Potencial da ozonização no controle de fitopatógenos em pós-colheita. In: Luz, W. C. da. (org.). **Revisão anual de patologia de plantas**. 1.ed. Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v.21, p.96-130. 2013.

GALLO, D. et al., **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920 p, 2002.

HOFMANN, C. et al., Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad.**, 1988. Sci. USA

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado%20Embrapa%20Soja:%20https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

JANSEN, A.; KIELSTEIN, J., The new face of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections. **Euro Surveill.** 2011;16:25.

JOHNSON, D. E.; MCGAUGHEY, W. H., Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Curr. Microbiol.**, v.33, p.54-59, 1996.

Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology.** 2004;2(2):123-40.

Knowles, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Adv. in insect Physiol.**, v.24, p.275-308, 1994.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A., Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: **Burges, H.D. (Ed.), Microbial Control of Pests and Plant Disease.** 1970–1980. Academic Press, London, pp. 837–896.

LANA, U. G. de P. et al., **Avaliação da Qualidade de Biopesticidas à Base de *Bacillus thuringiensis* Produzidos em Sistema “on farm”**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 23 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 191).

LARRY, M. B., Merck Sharp And Dohme. **Infecções estreptocócicas.** 2017. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doencas->

infeciosas/cocos-gram-positivos/infecções-estreptocócicas>. Acesso em: 20 out. 2019.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, [s.l.], v. 42, n. 117, p.518-534, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811714>.

MADIGAN, M. T. et al., **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAURER, C. P. et al. Adenovirus, enterovirus and thermotolerant coliforms in recreational waters from Lake Guaíba beaches, Porto Alegre, Brazil. **Journal Of Water And Health**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.1123-1129, 18 maio 2015. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2015.277>.

DE MENDONÇA NETO, A. C.; BURLE, E. C.; FIGUEIREDO, R. T., AGROTÓXICOS: Danos à saúde humana e ambiental. Existem outros caminhos?. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT**, v. 5, n. 3, p. 91, 2019.

MICHEREFF, Sami J. Fundamentos de fitopatologia. **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia–Área de Fitossanidade, Recife–PE**, 2001.

MINAGAWA, C. W., **Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpe de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios**. 2007. 108 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONNERAT, R. et al., **Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018. 32 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 360).

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W., Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

MUNDY, L. M.; SAHM D. F.; GILMORE, M., Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clin Microbiol Rev.** 2000; 13 (4): 513-22

NEXTER, E.; THOMASHOW, L. S.; METZ, M.; GORDON, M., 100 years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. **Am Acad Microbiol**, 2002, Washington, DC.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C., Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 2008;102(9):852-6.

PACHEPSKY, Yakov et al. Can E. colior thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters? **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], p.1-10, 8 set. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2014.954524>.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

RICHARDSON, M. D.; JOHNSON, E. M. Systemic mycoses. **The pocket guide to fungal infection. 1st ed. Oxford: Blackwell Science**, p. 54-73, 2000.

RISTUCCIA, P. A.; CUNHA, B. A., Klebsiella. **Infection Control**, [s.l.], v. 5, n. 7, p. 343-347, jul. 1984. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0195941700060549>.

ROCHA, G. G., **Fitopatologia**. Barra da Estiva: Instituto Formação, 2013.

ROCHA, S.L.S., Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do Multiplex- PCR. Dissertação de Mestrado. 2008. 68 f. Universidade do Rio Grande do Sul.

SARDI, J. C. O. et al., *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.10-24, 1 jan. 2013. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>.

SHEFF, B., Microbe of the mouth. *Salmonella*. **Nursing**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 81, 2002. Disponível em: <<http://search-ebshost-com.ez103.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=c8h&AN=106948963&lang=pt-br&site=ehost-live>>. Acesso em: 16 out. 2019.

SILVA, C. H. P. M., Bacteriologia: Um texto ilustrado. Minas Gerais: PUC, PUC Eventos, 1999. 531p.

SILVA, M. V., **Infecções do trato urinário por *Escherichia coli* Uropatogênica: uma revisão**. 2012. 35 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <[https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99WGN6/1/microbiologia\\_marcos\\_vin\\_cius\\_silva\\_monografia.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99WGN6/1/microbiologia_marcos_vin_cius_silva_monografia.pdf)>. Acesso em: 22 out. 2019.

SILVA, S. et al., *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.288-305, mar. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>.

STAMM, W. E., Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. **Transactions of the American clinical and climatological association**. V.117, p. 75-84, 2006.

STEVENS, D. A., Aspergilose. **Goldman L, Bennett JC, Drazen JM, Gill GN, Kokko JP, Mandell GL, Porruel DW, Schafer AI. Cecil tratado de medicina interna**. 21a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001

STEVENS, D. A. et al. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.696-709, 1 abr. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/313756>

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M.T. de, Engenharia genética de micro-organismos agentes de controle biológico. In: **MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.201-230.

VALICENTE, F. H.; LANA, U. G. de P.; PEREIRA, A. C. P.; MARTINS, J. L. A.; TAVARES, A. N. G. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 20 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 239).

THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.141-148, jun. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00606.x>.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 2012.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F., Microbiologia. Editora Atheneu, São Paulo, SP; 2008

WEINTRAUB, A., Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of medical microbiology**. 2007;56(1):4-8

ZIESE, T. et al., Surto de *Escherichia coli* O157 na Suécia. **Relatórios de investigação de surtos**. Vol.1, n.1, 1996. 16p.