



# TOXICIDADE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EM ORGANISMOS NÃO-ALVO

## Andresa Patrícia Regert Lucbo

Engenheira Agrônoma (UFRGS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

## Diouneia Lisiane Berlitz

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

## Emerson Luiz Nunes Costa

Engenheiro Agrônomo (UFRGS) e Mestre e Doutor em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS)

## Lidia Mariana Fiuza

Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS), Doutora em Ciências Agronômicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

nidae, Ichneumonidae e Tachinidae ocorrerem em lagartas recapturadas em plantas não tratadas, mantidas em condições de telado. Das lagartas coletadas em áreas tratadas com o bioinseticida, tanto em telado quanto a campo, não foi observada emergência de parasitóides.

Já Costa (2007), durante dois anos agrícolas, avaliou o efeito de inseticidas sobre os inimigos naturais de insetos-praga, por meio da quantificação de grupos taxonômicos de inimigos naturais presentes antes e após a aplicação de produtos químicos e biológicos em lavoura de arroz irrigado. Nesse estudo foram avaliados seis tratamentos (quatro inseticidas químicos sintéticos, um inseticida à base de *B. thuringiensis aizawai* e testemunha sem inseticidas) e cinco épocas de amostragem realizadas com rede de varredura do florescimento ao enchimento de grãos (prévia e aos 2, 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos - DAT). Entre os inimigos naturais coletados foram considerados oito subgrupos: aranhas, micro-himenópteros, coleópteros, odonatos, dermápteros, neurópteros, dípteros e hemípteros. No primeiro ano do estudo não foram observados efeitos significativos dos inseticidas sobre os inimigos naturais. No segundo ano, o inseticida lambda-cialotrina reduziu o total de inimigos naturais coletados aos 2DAT. O número de

O entomopatógeno *B. thuringiensis* tem elevada especificidade, porém para uma utilização segura são necessários ensaios toxicológicos com diferentes organismos não-alvo, sendo nesse trabalho apresentados dados referentes à toxicidade aos inimigos naturais, especialmente aos parasitóides e predadores de insetos, assim como às aves e aos mamíferos.

### 1.1 Efeitos de *B. thuringiensis* sobre predadores e parasitóides

Os inimigos naturais dos insetos são de suma importância, pois, além de desenvolverem seu papel ecológico de predação ou parasitismo, podem ser associados aos métodos alternativos de controle de pragas-alvo, através de criação massal em laboratórios (Gallo et al., 2002). O uso de inseticidas pode causar danos diretos e indiretos ao controle biológico natural, ao causar a mortalidade de insetos benéficos ou reduzir sua fonte alimentar pela mortalidade de insetos-praga (Shepard et al., 1987; Wick & Freier, 2000; Berti Filho & Ciociola, 2002). Por isso, o uso de bioinseticidas que controlam as pragas com baixo impacto sobre organismos benéficos deve ser incentivado (Fragoso et al., 2001; De grande et al., 2002).

Nesse sentido, Dequech et al. (2005) estudaram a interação entre o parasitóide *Camponotus flavicinctus* e *B. thuringiensis aizawai* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório. Os autores avaliaram o consumo alimentar e a mortalidade de lagartas parasitadas, infectadas pela bactéria, e parasitadas e infectadas, além da biologia dos parasitóides emergidos a partir de lagartas infectadas e não infectadas pela bactéria. O menor consumo foliar e a maior taxa de mortalidade foram observados em lagartas afetadas pelos dois agentes de controle bio-

lógico. No caso do parasitóide, não foram verificadas alterações nas características biológicas dos seus descendentes emergidos de lagartas infectadas com *B. thuringiensis*.

Segundo Stevenson & Walters (1983), embora a toxicidade de inseticidas possa ser avaliada em condições de laboratório, só é possível medir o efeito real do pesticida em condições de campo, onde ocorrem as situações naturais de abrigo, proteção, alternativas de escape, alimentação e sobrevivência das espécies. Esses autores também destacam que as condições meteorológicas, o comportamento e o ciclo de vida de cada espécie e a dose aplicada são fatores que influenciam a toxicidade dos inseticidas.

Lucho (2004) avaliou a emergência de parasitóides em lagartas de *S. frugiperda* recapturadas em arroz irrigado com e sem tratamento de *B. thuringiensis aizawai* em condições de telado e a campo. A emergência de parasitóides das famílias Braco-





**Figura 1.** Mortalidade de camundongos CF1 submetidos aos tratamentos intraperitoneais com *Bacillus thuringiensis*, (Susp. = suspensão contendo células e esporos; Sob. = sobrenadante da cultura; Prot. = proteína purificada; Test. = testemunha tratada somente com água; Número total de indivíduos = 15 por tratamento)

coleópteros predadores, representados em sua maioria por Coccinellidae (“joaninhas”), foi reduzido significativamente aos 2DAT por lambdacialotrina, carbaril, malationa e imidacloprido. Nos dois anos do estudo não foi observado efeito significativo de *B. thuringiensis* sobre o número de inimigos naturais coletados após a aplicação do bioinseticida.

Em outra pesquisa, Nascimento et al. (1998) avaliaram o efeito de *B. thuringiensis kurstaki* sobre o predador de lagartas de lepidópteros, *Podisus nigrispinus*, em laboratório. Em seus resultados, não foi observada a presença de esporos ou células vegetativas do entomopatógeno na hemolinfa do predador, apenas no intestino médio e nas fezes. Os autores relatam que, em laboratório, são utilizadas altas dosagens de biopesticida e oferecido apenas uma alternativa alimentar e que, em campo, o predador tem alternativas de alimentação, não dependendo somente de uma presa infectada.

Além dos produtos formulados a base de *B. thuringiensis*, atualmente as pesquisas na área biotecnológica visam a transformação genética de plantas com os genes *cry* de *B. thuringiensis* para conferir a resistência dessas plantas aos insetos-praga. Plantas de milho, algodão e batata transgênicos têm sido comercializados (Shelton et al. 2002), porém, os dados de O’Callaghan et al. (2005) revelam que não foram detectados efeitos dessas plantas em insetos benéficos, como polinizadores e inimigos na-

turais.

Nesse contexto, Romeis et al. (2008) relatam que dados como a descrição da cultivar, as características moleculares dos elementos genéticos inseridos na planta, a natureza e a estabilidade da expressão proteica, o espectro de ação das proteínas, a composição de macro e micronutrientes e as características morfológicas e agrônômicas da planta, são exigidos pelas autoridades para a regulamentação dessas plantas. Os autores mostram que o milho modificado com o gene expressando a proteína Cry 1Ab de *B. thuringiensis*, ativa a insetos da ordem Lepidoptera, não afeta insetos de outras ordens. Ou seja, as proteínas de *B. thuringiensis* são altamente específicas, não atingindo artrópodes não alvos.

Na revisão de Fontes et al. (2002) são discutidos princípios e questões ecológicas, impacto ambiental e efeitos de plantas geneticamente modificadas no ambiente. Em relação aos inimigos naturais, os autores relatam a existência de fatores importantes em relação às plantas, como o ciclo de vida (anual ou perene) que difere na composição das comunidades de artrópodes associados a essas plantas. Dos 41 trabalhos avaliados pelos autores, 20 foram conduzidos em laboratório e desses, 14 não mostraram efeito sobre inimigos naturais, quando utilizadas plantas modificadas e não modificadas. No restante (6 trabalhos) não foram observados efeitos em alguns inimigos naturais. E em 14 de 21 trabalhos avaliados em campo, os autores não mostraram dife-

rença na densidade de inimigos naturais entre áreas com plantas-Bt e plantas não transgênicas. Porém, nos 7 casos restantes ocorreu um decréscimo nessa densidade.

No trabalho de Chen et al. (2008) foram avaliados os efeitos diretos e indiretos da proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* que está presente em plantas transgênicas de milho e algodão, sobre o parasitóide da lagarta *Plutella xylostella*, *Diadegma insulare*. Os autores utilizaram a planta transgênica e a proteína proveniente de uma formulação líquida comercial (MC), em três tratamentos: a proteína purificada, o produto comercial e a planta transgênica. Também avaliaram o efeito de inseticidas a base de spinosad, indoxacarb, lambda-cialotrina e cipermetrina. Em seus resultados, observaram que, mais de 90% das lagartas foram parasitadas após a ingestão dos tratamentos, indicando que esses não influenciam o parasitismo. Porém, o número de *D. insulare* emergidos das lagartas, diferiu entre o controle e o grupo tratado com a formulação comercial, mas não diferiu entre o controle e as lagartas tratadas com a planta expressando a proteína Cry 1Ac ou somente com a proteína purificada.

Os autores citados também demonstraram que o parasitóide *D. insulare* foi altamente suscetível aos inseticidas comumente utilizados para o controle das lagartas de *P. xylostella*, ocorrendo a morte dos mesmos após duas horas de contato. Sendo assim, os inseticidas usados afetam as populações do parasitóide e, consequentemente aumentam as populações do inseto praga-alvo, no caso, *P. xylostella*.

Estudo semelhante foi realizado por Torres & Ruberson (2008) com a mesma proteína expressa em plantas de algodão. Os resultados desse estudo mostraram que a proteína foi detectada em três níveis tróficos avaliados, porém, os insetos predadores e parasitas das lagartas de *S. exigua* não foram afetados quando as lagartas foram alimentadas com algodão transgênico.

Um caso bem polêmico entre a comunidade científica, foi o trabalho de Losley et al. (1999) que mostrou que o milho geneticamente modificado com a proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis*, afetou severamente a população da borboleta monarca, *Danaus plexippus*. Em seu trabalho foi comparado a alimentação, o crescimento e a mortalidade de lagartas que se alimentavam de plantas com pólen Bt, com pólen de milho não modificado e plantas sem pólen. O resultado apresentou sobrevivência de 56% com milho-Bt e 100% de sobrevivência com pólen normal e sem pólen.

Entretanto novas pesquisas foram realizadas posteriormente como Stanley-Horn, et al. (2001) que avaliou 6 híbridos de *B. thuringiensis* em quatro cidades diferentes (EUA) divididos em duas etapas (na borda e na parte interna das lavouras) frente à *D. plexippus*. As conclusões dos auto-

res fornecem evidências de que a quantidade de pólen e a expressão de Cry1Ab no pólen predizem um impacto na alimentação das lagartas da monarca, porém isso ocorre em lagartas do 1º instar, sendo que não ocorrem diferenças significativas da sobrevivência da monarca nas regiões com *milho-Bt* e milho não transgênico. Além disso, os autores identificaram a mortalidade de lagartas poucas horas após a alimentação em áreas com milho não transgênico pulverizados com  $\lambda$ -cicalotrina. A sobrevivência e o crescimento foram afetados também em áreas próximas ao local. Entretanto pesquisas devem continuar sendo realizadas para entender o impacto do milho não transgênico sendo que é relativamente de baixa toxicidade a borboletas monarca.

Apesar desses dados o conhecimento a respeito da influência de novas tecnologias seja para a produção de biopesticidas ou para a transgenia, ainda são carentes de informação. Entretanto, os estudos realizados até então indicam que efeitos nocivos em organismos não-alvo verificados em laboratório são raramente detectados no ambiente, provavelmente porque a quantidade de produto utilizada em laboratório é superior àquela utilizada e recomendada em campo.

### 1.2 Efeitos de *B. thuringiensis* sobre aves

Um grupo de predadores de lagartas, os pássaros, também deve ser avaliado em relação ao uso de biopesticidas ou plantas geneticamente modificadas. Porém existem poucos dados na literatura a respeito desse assunto. Os autores Sopuck et al. (2002) relatam a utilização do produto comercial Foray 48B a base de *B. thuringiensis kurstaki*, para o controle de *Lymantria dispar* e avaliaram a resposta de pássaros associados ao sul da Ilha de Vancouver, no Canadá. Em seus resultados não observaram diferença na abundância relativa de pássaros nas áreas tratadas e não tratadas com o biopesticida, entre os anos de 1999 e 2000, indicando que o tratamento não influencia na presença dos mesmos.

Já Norton et al. (2001) avaliaram o efeito secundário da mesma subespécie de *B. thuringiensis* citada acima porém proveniente do produto Thuricide, em aves da espécie *Dendragapus canadensis*. Os autores citam essa ave como um herbívoro primário, porém os pintos, em suas primeiras duas semanas de vida, são essencialmente insetívoros. Lattner (1982) descreve a alimentação dessa ave como sendo cerca de 64% de lagartas, seguido de gafanhotos (10%), formigas (7%) e outras variedades de invertebrados e partes de plantas. O trabalho de Norton et al. (2001) teve como objetivo avaliar os itens da dieta e o crescimento de *D. canadensis* em áreas tratadas e não tratadas com *B. thuringiensis kurstaki*. Os resultados indicam que o crescimento dos pintos foi afetado em relação às

duas áreas, ocorrendo uma redução de 30% no tamanho desses na área tratada com a bactéria. Porém esses dados podem estar relacionado ao fato de que, com a morte das lagartas devido à ingestão do patógeno, os pintos passaram a se alimentar principalmente de formigas e estas tem um baixo índice de proteínas em comparação com às lagartas. Isso pode ser determinante para o decréscimo no tamanho dos pintos, uma vez que a dieta alimentar teve seu teor de proteínas também reduzido.

### 1.3 Efeitos de *B. thuringiensis* sobre mamíferos

Pequenos mamíferos, como ratos e camundongos, também estão associados às áreas agrícolas uma vez que esses animais podem se alimentar dos grãos das culturas. Então também existem pesquisas que avaliam o possível efeito do entomopatógeno nesses mamíferos, sendo que a bactéria também pode produzir toxinas ativas a esses animais.

Na área da saúde, os trabalhos de Prasad & Shethna (1975) sugerem que as proteínas de *B. thuringiensis* têm atividade antitumoral em sarcoma Yoshida em ratos, além de acentuarem a resposta imune de ovelhas. Yamashita et al. (2000), também demonstram efeito citocida em células de leucemia, em ensaios *in vitro*.

Em relação a humanos, a revisão de Siegel (2001) apresenta dados em que o produto Thuricide (*B. thuringiensis thuringiensis*) foi ingerido (100mg) e inalado (100mg) por 18 pessoas, durante 5 dias, e esses não apresentaram nenhuma reação decorrente do microrganismo. Além dessa reportagem, o trabalho apresenta alguns dados sobre isolados de *B. thuringiensis* que foram re-isolados de queimaduras ou feridas de pessoas, entretanto foi averiguado que a água utilizada para a limpeza desses ferimentos estava contaminada. Além disso, o autor relata que o isolado pode se desenvolver nesses locais feridos quando o sistema imune não está respondendo de forma adequada ao ferimento, mas não causa nenhuma reação.

Betz et al. (2000) relatam que *B. thuringiensis kurstaki* foi administrado em humanos voluntários durante 3 dias, na quantidade de 1000mg/pessoa ou  $1 \times 10^9$  esporos/mL, e não apresentaram sintomas de toxicidade, nem culturas de células bacterianas nas amostras de sangue avaliadas. Os autores relatam a presença das proteínas Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry 2Aa no isolado testado.

Diferentes autores relatam os resultados de suas pesquisas com ratos tratados com *B. thuringiensis*. No caso de Bishop et al. (1999), a aplicação oral de  $5.10^{10}$  esporos/dia de *B. thuringiensis thuringiensis* e *B. thuringiensis israelensis*, em ratos não mostrou diferença significativa no peso corporal dos animais tratados e não tratados. Nos dados de Siegel (2001), ratos foram trata-

dos via oral com  $10^9$  esporos/dia, por 730 dias, também não apresentaram nenhuma reação.

Também em ensaios toxicológicos, Berlitz et al. (2006) avaliaram o efeito da suspensão de células e esporos de *B. thuringiensis aizawai* proveniente do produto comercial Xentari e *B. thuringiensis thuringiensis* (H1), em ratos Wistar. Os autores avaliaram o conteúdo estomacal e as fezes em SDS-PAGE, onde os resultados sugerem que as proteínas são degradadas no estômago dos animais. Os estômagos foram avaliados em estereomicroscópio (40x) não apresentando modificações superficiais, como pípocas vermelhas ou raías hemorrágicas, em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que as proteínas de *B. thuringiensis* não afetam os ratos quando administradas oralmente.

Em outra pesquisa, Berlitz (2006) avaliou a suspensão e as proteínas purificadas de dois novos isolados bacterianos, em camundongos CF1, via oral e intraperitoneal, divididos em grupos de 5 animais e três repetições. Os dados dos tratamentos, via oral, não causaram mortalidade dos camundongos, porém nas administrações intraperitoneais os camundongos morreram a partir de 6 horas após a aplicação dos tratamentos, quando aplicada a suspensão bacteriana contendo células e esporos (Figura 1).

Apesar desses resultados, deve-se salientar que injeções intraperitoneais não são uma via de acesso natural do entomopatógeno nos mamíferos. Essa mortalidade também não deve estar associada à thuringiensina, uma proteína tóxica a vertebrados que é produzida pelo entomopatógeno, pois essa toxina está presente no sobrenadante da cultura, e esse tratamento não causou a mortalidade dos animais.

O tratamento via oral, não causou reações nos camundongos. Nesse sentido, Betz et al. (2000) revelam que as proteínas Cry1, Cry2 e Cry3 são degradadas em 30 segundos após a ingestão, em ensaios *in vitro*, resultando em proteínas de 2 kDa. Também, os dados de Vasquez-Padrón et al. (2000) e Moreno-Fierros et al. (2000) revelaram que camundongos Balb/c apresentaram elevada produção de anticorpos IgA, seguidos de IgG e IgM, após a administração oral, retal e intraperitoneal da proteína Cry1Ac, mostrando uma eficiente resposta imune desses animais.

Como já comentado anteriormente, as preocupações têm sido em torno dos efeitos das plantas geneticamente modificadas com genes de *B. thuringiensis* em seus consumidores. Porém, Azevedo & Araújo (2003) mostram a ausência de efeitos tóxicos, mutagênicos, teratogênicos ou clastogênicos dessas plantas. Betz et al. (2000) também relatam que as proteínas Cry de *B. thuringiensis* não são tóxicas em contato direto, sendo que a exposição de animais não-alvo é extremamente baixa e a presença dessas proteínas nos tecidos vegetais também ocorre em baixas concentrações. Romeis et al.

(2008) também comentam que os testes laboratoriais utilizando essas plantas, são conduzidos com elevadas concentrações da proteína purificada, muito acima daquelas concentrações encontradas nos tecidos das plantas.

Apesar desses dados, periodicamente estão sendo lançados produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* e que, para chegarem ao mercado devem passar por diferentes análises para confirmar a não toxicidade em organismos não-alvo. O mesmo ocorre com as plantas geneticamente modificadas que são testadas em diferentes organismos para garantir a sua segurança. Nesse sentido, a Lei de Biossegurança nº 11.105, estabelece as normas de segurança e os mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados e seus derivados.

#### 1.4 Referências

- Azevedo J L, Araújo W L 2003. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. *Mutation Research*. 544: 223-233.
- Berti Filho, E.; Ciociola, A.I. Parasitóides ou predadores? Vantagens e desvantagens. In: Parra, J.R.P. (ed.); Botelho, P.S.M.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Bento, J.M.S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. Cap. 3, p.29-41.
- Berlitz, D.L.; Giovenardi, M.; Fiuza, L.M. 2006. Toxicology effects of  $\alpha$ -endotoxins and  $\delta$ -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Wistar* rats. *Neotropical Biology and Conservation*. 1(1): 35-38.
- Berlitz, D.L. 2006. Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* e *Melia azedarach* em organismos associados a orizicultura. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 83p.
- Betz F S, Hammond B G, Fuchs R L 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*: protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 32:156-173.
- Bishop A H, Johnson C, Perani M 1999. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15:375-380.
- Chen, M.; Zhao, J.Z.; Collins, H.L.; Earle, E.D.; Cão, J.; Shelton, A.M. 2008. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *Plos One*. 3(5):e2284: 1-7.
- Costa, E.L.N. Ocorrência de artrópodes e seletividade de inseticidas na cultura do arroz irrigado. Tese (Doutorado em Fitotecnia – Fitossanidade), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. Porto Alegre: UFRGS, 2005, 59p.
- Degrande, P.E.; Reis, P.R.; Carvalho, G.A.; Belarmino, L.C. Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais. In: Parra, J.R.P. (ed.); Botelho, P.S.M.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Bento, J.M.S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. Cap. 5, p.71-93.
- Dequech, S.T.B.; Silva, R.F.P. da; Fiuza, L.M. 2005. Interação entre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Bacillus thuringiensis aizawai*, em laboratório. *Neotropical Entomology*. 34(6): 937-944.
- Fontes, E.M.G.; Pires, C.S.S.; Sujii, E.R.; Panizzi, A.R., 2002. The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotropical Entomology* 31(4), 497-513.
- Fragoso, D.B.; Jusselino-Filho, P.; Guedes, R.N.; Proque, R. 2001. Seletividade de inseticidas a vespas predadoras de *Leucopoptera coffeella* (Guér.-Mènev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Neotropical Entomology*. 30(1): 139-144.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C. de; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- Latner, M.T. 1982. Foods, mobility, habitat selection and density of spruce grouse. Master tesis, University of Toronto, Toronto, Ontario.
- Lucho, A.P.R. Manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz irrigado. Dissertação (Mestrado em Diversidade e Manejo da Vida Silvestre), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2004. São Leopoldo: UNISINOS, 2004, 73p.
- Losey, J.E.; Rayor, L.S.; Carter, M. E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399:214.
- Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revila R, Vasqués-Padrón R I 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry 1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune response in Balb/c mice. *Microbes Infect* 2:885-890.
- Nascimento, M.L.; Capalbo, D.F.; Moraes, G.J.; de Nardo, E.A.; Maia, A.H.N.; Oliveira, R.C.A.L. 1998. Effect of a formulation of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* on *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 178-180.
- Norton, M.L.; Bendell, J.F.; Bendell-Young, L.I.; Leblanc, C.W. 2001. Secondary effects on the pesticide *Bacillus thuringiensis kurstaki* on chicks os spruce grouse (*Dendragapus Canadensis*). *Arquivos of Environmental Contamination and Toxicology*. 41: 369-373.
- O'Callaghan M O, Glare T R, Burgess E O J, Malone L A 2005. Effects os plantds genetically modified for insect resistance on nontarget organismos. *Annual Review of Entomology*. 50: 271-292.
- Prasad S S S V, Shethna Y I 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry Biophysic Research Comm* 62:517-521.
- Romeis, J.; Bartsch, D.; Bigker, F.; Candolfi, M.P.; Gielkens, M.M.C.; Hartley, S.E.; Hellmich, R.L.; Huesing, J.E.; Jepson, P.C.; Layton, R.; Quemada, H.; Raybound, A.; Rose, R.I.; Schiemann, J.; Sears, M.K.; Shelton, A.M.; Sweet, J.; Vaituzis, z.; Wolf, J.D. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology* 26(2): 203-208.
- Shepard, B.M.; Barrion, A.T.; Litsinger, J.A. Friends of the rice farmer: helpful insects, spiders, and pathogens. Manila: IRRRI, 1987. 136 p.
- Shelton A M, Ahao J Z, Roush R T 2002. Economic, ecologycal, food safety and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47:845-881.
- Siegel, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*. 77:13-21.
- Stanley-Horn, D.E.; Dively, G.P.; Hellmich, R.L.; Mattila, H.R.; Sears, M.K.; Rose, R.; Jesse, L.C.H.; Losey, J.E.; Obrycki, J.J.; Lewis, L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *PNAS*, 98 (21): 11931-11936.
- Stevenson, J.H.; Walters, J.H.H. 1983. Evaluation of pesticides for use with biological control. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 10: 201-215.
- Sopuck, L.; Ovaska, K.; Whittington, B. 2002. Responses of songbirds to aerial spraying of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Foray 48B) on Vancouver island, british Columbia, Canada. 1664-1672.
- Torres, J.B.; Ruberson, J.R. 2008. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heretopterans. *Transgenic Research* 17: 345-354.
- Vásquez-Padrón, R.I.; Moreno-Fierros, L.; Neri-Bazan, L.; Martínez-Gill, A.F.; De La Riva, G.A.; López-Revilla, R. 2000. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry 1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 33: 147-155.
- Wick, M; Freier, B. 2000. Long-term effects of an insecticide application on non-target arthropods in winter wheat – a field study over 2 seasons. *Journal of Pest Science* 73: 61-69.
- Yamashita S, Akao T, Mizuki E, Saitoh H, Higuchi K, Kim H, Ohba M 2000. Characterization of the anti-cancer-cell paraesporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Can J Microbiol* 46:913-919.