



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACILLUS
THURINGIENSIS COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE
Aedes Aegypti (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

FERNANDO PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACILLUS
THURINGIENSIS COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE
Aedes Aegypti (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. José Lopes

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237c Santos, Fernando Pereira dos.

Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial para controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) / Fernando Pereira dos Santos. – Londrina, 2010. 62 f. : il.

Orientador: José Lopes.

Co-orientador: Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Boas.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Inseticidas biológicos – Teses. 2. Inseto – Controle biológico – Teses. 3. *Aedes aegypti* – Teses. 4. Dengue – Teses. 5. Díptero – Teses. 6. Inseto como transmissor de doenças – Teses. 7. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Lopes, José. II. Vilas-Boas, Gislayne Fernandes Lemes Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.937

FERNANDO PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACILLUS THURINGIENSIS
COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE *Aedes Aegypti*
(LINNAEUS, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lopes
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Gislayne Trindade Fernandes Vilas
Boas
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi
UNIFIL – Londrina - PR

Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez
EMBRAPA – Londrina - PR

Profa. Dra. Olívia Marcia Nagy Arantes
EMBRAPA – Londrina - PR

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas Boas
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Mauricio Ursi Ventura
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. José Lopes
Orientador
UEL – Londrina - PR

Londrina, 12 de agosto de 2010.

DEDICATÓRIA

À Deus

Aos meus familiares especialmente à minha esposa, meu filho, meus pais, irmão e a todos que me apoiaram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, acima de tudo, por ter abençoado a minha vida, me encorajado a vencer os obstáculos, me incentivado a querer sempre o melhor que posso fazer e, principalmente, por colocar em meu caminho pessoas iluminadas que fizeram parte deste trabalho e tornaram-o possível.

Aos meus pais, Miguel Pereira dos Santos e Grácia de Fátima Gregório dos Santos, amigos, companheiros, patrocinadores, agradeço hoje por toda confiança e dedicação que depositaram sobre mim, pelas preocupações de todos os dias, pelo amor e incentivo, por me apoiarem em cada decisão e por acreditarem na minha capacidade. Vocês são exemplos na minha vida, e se hoje sou um pouquinho de cada um de vocês já me sinto um vitorioso.

À minha esposa, Giselle de Andrade Ishida dos Santos, que sempre foi mais que uma esposa e sim uma grande amiga e sempre compreensiva e companheira em todos os momentos de dificuldades. Obrigado amor por tudo.

Ao meu filho, Fernando Ishida dos Santos que me deu força para cumprir esta tarefa e superar as dificuldades emocionais.

Ao meu irmão, minha cunhada e sobrinhos, Miguel Pereira dos Santos Junior, Luciana Aparecida Schmidt dos Santos, Gabriel Schmidt dos Santos e Giovana Schmidt dos Santos, sempre companheiros, amigos e que ajudou com todo seu jeito prestativo, carinhoso, preocupados e especial, que souberam me apoiar e me incentivar em todos os momentos.

Ao orientador, Dr. José Lopes, pela amizade, compreensão, atenção, apoio e pelo conhecimento compartilhado neste trabalho. A esta pessoa iluminada eu agradeço imensamente a paciência em me ensinar, pois considero o senhor (como sempre o chamei) meu “pai científico” pois devo muito ao senhor pelo conhecimento adquirido em todos estes anos compartilhados.

Ao co-orientador, Dra. Gislayne Trindade Fernandes Vilas Boas, pela amizade, atenção, dedicação, preocupação, e principalmente, pelos conselhos que levarei por toda a vida.

Aos Colegas de Laboratório, pela amizade, auxílio e prestatividade durante toda a realização do trabalho.

Ao grande Amigo, João Antônio Ciryno Zequi, que sempre me ajudou, sou uma pessoa extremamente grata pela sua amizade e por suas orientações em minha vida profissional.

Enfim... À todos aqueles que de um forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho! MUITO OBRIGADO!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
Voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

SANTOS, F. P. **Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial para controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** 2010. 62 f. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

RESUMO

Aedes aegypti (Linnaeus), principal vetor do vírus da febre dengue no Brasil, tem sido combatido com o uso maciço de produtos químicos, contribuindo com o aparecimento de populações resistentes, dificultando ainda mais o controle do inseto. Atualmente uma alternativa para este controle é a utilização de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis israelensis*. A atividade larvicida desta linhagem está relacionada com a produção de inclusão parasporal que é sintetizada durante a esporulação. Estes cristais protéicos são compostos por variações de proteínas Cry e Cyt. Estas proteínas são sintetizadas na forma de protoxinas, portanto, sua ação depende da ativação, a qual ocorre no intestino do inseto mediante a alcalinidade do meio. A ação destas toxinas causa a paralisia do aparelho digestório, ocasionando morte por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia. Diante de diversas vantagens apresentadas pelos bioinseticidas, vários trabalhos são desenvolvidos com o intuito de isolar novas linhagens bacterianas com potencial entomopatogênico. Para estes estudos utiliza-se metodologias como a caracterização genética, que possibilita discriminar isolados bacterianos através do conhecimento de seu genoma. A técnica utilizada é a de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR) que envolve a síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e com a aplicação de iniciadores (“primers”) que delimita as sequencias específicas. Esta técnica permite estudos de diversidade de linhagens propiciando o isolamento de novos agentes biológicos com potencial entomopatogênico. A forma de teste *in vivo* da real atividade tóxica sobre o inseto é a metodologia de bioensaio, que consiste em expor os seres vivos alvo a uma determinada substância, sob condições controladas

Palavras – chave: Controle biológico. Bioensaio. PCR. Diptera. Dengue.

SANTOS, F. P. **Characterization of isolates of *Bacillus thuringiensis* with potential to control *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 2010. 62 p. PhD Thesis in Agronomy – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

ABSTRACT

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762), the main vector of dengue fever in Brazil, has been controlled by the massive use of chemical products. This technique has fostered the upsurge of resistant mosquito populations and hindered the control of the insect. Currently, bioinsecticides containing *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner are an alternative for vector control. The larvicidal activity of the lineage is related to the production of parasporal inclusion, which is synthesized during sporulation. These proteic crystals are made of variations of the Cry and Cyt proteins, which are synthesized as protoxins; therefore, their action depends on the activation caused by the medium alkalinity of the intestinal tract of the insect. These toxins cause paralysis of the digestive system, leading to death by inanition, generalized muscle paralysis, and septicaemia. The advantages of bioinsecticides have led to significant efforts to isolate new bacterial lineages with entomopathogenic potential. One of the methodologies used in such studies is genetic characterization, which allows for the discrimination of bacterial isolates according to genome. The technique used is Polymerase Chain Reaction (PCR), which consists of in vitro enzymatic synthesis of a specific DNA segment in presence of the DNA polymerase enzyme and the application of primers to determine specific sequences. This technique allows for studies on lineage diversity leading to the isolation of new biological agents with entomopathogenic potential. The bioassay methodology consists of in vivo tests of the actual toxic effect of a specific product on live specimens, under controlled conditions.

Key – words: Biological control. Bioassay. PCR. Diptera. Dengue.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** – Cultura esporulada de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, evidenciando os esporos elipsóides (seta vermelha) e os cristais protéicos arredondados (seta azul). Aumento de 1000 vezes. Coloração: Amido-Black e Fucsina19
- Figura 2.2** – Modos de ação das toxinas Cry. Os passos 1 a 3 são iguais nos dois modelos. O modelo “formação de poros” está representado na porção superior pelos números 4 a 6. A etapa 4 refere-se à oligomerização das toxinas, a 5 à ligação ao segundo receptor e a etapa 6 à inserção da toxina na membrana e formação dos poros. O modelo “sinal de transdução” está representado na porção inferior pelos números 4a e 5a. A etapa 4a refere-se à ligação da toxina ao receptor e estimulação da proteína G, que estimularia a adenilato ciclase (etapa 5a) e após uma série de reações em cascata, comprometeriam o equilíbrio interno **celular**21
- Artigo A**
- Figura 4.1** – Eletroforese da determinação dos genes: *cry4A* (A) e *cry4B* (B), para amostras dos isolados Br 26 (1), Br 14 (2), Br 36 (3), Br 46 (4), Br 64 (5), Bti (6) e IPS82 (7), do banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina; marcador molecular “1Kb DNA ladder”52
- Figura 4.2** – Eletroforese da determinação dos genes: *cry10* (A) e *cry11* (B), para amostras dos isolados Br 14 (1), Br 26 (2), Br 36 (3), Br 64 (4), Br 46 (5), Bti (6) e IPS82 (7) , do banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina; marcador molecular “1Kb DNA ladder”52
- Figura 4.3** – Eletroforese da determinação dos genes: *cyt1* (A) e *cyt2* (B), para amostras dos isolados Br 14 (1), Br 26 (2), Br 36 (3), Br 64 (4), Br 46 (5), Bti (6) e IPS82 (7) , do banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina; marcador molecular “1Kb DNA ladder”53

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Tabela 4.1** – Origem dos isolados de *B. thuringiensis* utilizados nos bioensaios para se determinar a toxicidade sobre larvas de *Aedes aegypti*42
- Tabela 4.2** – Genes iniciadores e condições de amplificação utilizadas para pesquisa de genes *cry* e *cyt* em isolados de *B. thuringiensis* 45
- Tabela 4.3** – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti*, submetidas a diferentes concentrações de suspensões de isolados de *B. thuringiensis*, 24 horas após a aplicação da suspensão bacteriana. (Temperatura ambiente: 26 °C ±2°C; UR: 60 ± 10%).....47
- Tabela 4.4** – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti*, submetidas a diferentes concentrações de suspensões de isolados de *B. thuringiensis*, após 24 horas da aplicação da suspensão bacteriana. (Temperatura ambiente: 26 °C ±2°C; UR: 62 ± 10%)..... 48
- Tabela 4.6** – Valores de CL₅₀ e CL₉₅ (em ppm)de isolados de *B. thuringiensis* contra lavas de quarto instar de *A. aegypti*, após 24 horas do início do bioensaio de dose. Temperatura: 25 ± 2 °C; UR: 60 ± 10%49
- Tabela 4.7** – Valores de CL₅₀ e CL₉₅ (em ppm)de isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de quarto instar de *A. aegypti* em temperaturas de 15, 25 e 35°C ± 1°C; Fotoperíodo 12E: 12L 50
- Tabela 4.8** – Valores de CL₅₀ (em ppm) de isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de quarto instar de *A. aegypti* em diferentes valores de pH. Temperatura: 25°C ± 1°C; Fotoperíodo 12E: 12L 50
- Tabela 4.9** – CL₉₅ de isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de quarto instar de *A. aegypti* em diferentes valores de pH. Temperatura: 25°C ± 1°C; Fotoperíodo 12E: 12L 51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 BIOLOGIA, IMPORTÂNCIA MÉDICA E MÉTODOS DE CONTROLE DE <i>Aedes Aegypti</i>	15
2.2 Características Gerais de <i>Bacillus Thuringiensis</i>	17
2.3 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> SUBESP. <i>ISRAELENIS</i>	23
2.4 TÉCNICA DE PCR (REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE)	24
2.5 PRODUÇÃO DE <i>B. THURINGIENSIS</i>	26
2.6 BIOENSAIO	28
3 REFERENCIAS	30
4 ARTIGO A – Prospecção de novas linhagens de <i>Bacillus</i> com potencial utilização para controle de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)	37
4.1 INTRODUÇÃO	39
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.2.1 Linhagens Bacterianas	41
4.2.2 Produção de Esporos e Cristais	41
4.2.3 Bioensaios	42
4.2.4 Reação de PCR	44
4.3 RESULTADOS	46
4.3.1 Bioensaio Seletivo	46
4.3.2 Bioensaio quantitativo (CL ₅₀ e CL ₉₅)	48
4.3.3 Bioensaio (CL ₅₀ e CL ₉₅) em diferentes temperaturas	49
4.3.4 Bioensaio (CL ₅₀ e CL ₉₅) em diferentes concentrações hidrogeniônicas	50
4.3.5 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
4.4 DISCUSSÃO	53
4.5 CONCLUSÃO	57
5 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é transmissor do vírus da dengue e da febre amarela urbana para o homem. É antropofílico, sinantrópico e as fêmeas depositam seus ovos preferencialmente em local com água parada e com pouca quantidade de matéria orgânica.

A urbanização desordenada, que ocorre na maioria dos municípios brasileiros, acarreta problemas de infraestrutura como o acúmulo de lixo em locais impróprios e sistemas de drenagem de água e esgoto ineficientes. Estes fatores aliados ao clima tropical favorecem o aparecimento de criadouros artificiais deste mosquito, principalmente nos meses onde a temperatura é mais elevada.

A dengue na forma clássica acomete a maioria dos que se infectam, causando, muitas vezes, reclusão temporária com prejuízos das atividades profissionais, afetando diretamente sua qualidade de vida. A febre dengue hemorrágica é uma doença grave que pode levar à óbito.

No Brasil, as larvas de *A. aegypti* são controladas, através do organofosforado Temephós. Este larvicida não tem seletividade para os organismos alvo e tem sido constatadas populações de mosquitos resistentes ao organofosforado. A partir do ano de 2000, houve algumas tentativas de se introduzir nas campanhas, larvicidas biológicos seletivos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner apresenta variedades tóxicas contra insetos das ordens Lepidoptera (borboletas e mariposas), Coleoptera (besouros) e Diptera (mosquitos e moscas). Mais recentemente, novos isolados desta espécie têm se mostrado ativos contra nematódeos, ácaros e protozoários e diversas pesquisas estão sendo direcionadas na procura de novas linhagens tóxicas. No Brasil, destacam-se os trabalhos desenvolvidos pelo Instituto Oswaldo Cruz (RJ) (ARANTES *et al.*, 2002).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria de solo Gram-positiva que durante a fase vegetativa e de esporulação, produz proteínas com atividade entomopatogênica. Entre as proteínas produzidas por *B. thuringiensis*, as que apresentam maior interesse para o controle de insetos-pragas são as δ -endotoxinas, denominadas também como proteínas-cristal ou proteínas Cry. As diversas

proteínas Cry possuem especificidades diferentes contra ordens de insetos (HOFTE e WHINTELEY, 1989; SCHNEPF *et al.*, 1998; DE MAAGD *et al.*, 2003).

Segundo Lecadet *et al.* (1999), a classificação das linhagens da espécie *B. thuringiensis*, é baseada nas propriedades bioquímicas e composição do antígeno flagelar, não levando em consideração o perfil de toxicidade apresentado pelas linhagens, o qual é definido principalmente pelo tipo de δ -endotoxina produzida. Também, esta diversidade de linhagens demonstra o elevado grau de variabilidade genética apresentado pela espécie.

Dentre as espécies de *B. thuringiensis* destaca-se *B. thuringiensis* subsep. *israelensis*, isolada nos anos 1970 em Israel, a qual é a primeira bactéria utilizada em programas de controle biológico de dípteros em todo o mundo. Apresenta atividade inseticida contra larvas de mosquitos pertencentes aos gêneros *Aedes* e *Culex*. Também possui ação tóxica contra larvas de mosquitos da família dos Simuliidae (borrachudos), insetos transmissores de patógenos como o da oncocercose, cujas picadas causam intenso desconforto, reações alérgicas e infecções na pele. É totalmente inócua a outros invertebrados, ao homem e a outros mamíferos, bem como a vertebrados aquáticos e plantas.

A atividade larvicida do *B. thuringiensis israelensis* está relacionada à produção de da δ -endotoxina, sintetizada durante o processo de esporulação. A toxina produzida não permanece associada ao endosporo, sendo liberada no meio de cultivo. Entretanto, em algumas subespécies ativas contra dípteros, ocorre a formação de cristais protéicos formados também por toxinas citolíticas.

Por se tratar de biotecnologia em pleno desenvolvimento, fazem-se necessários estudos que visem selecionar novas linhagens de bactérias de amostras de solo, com capacidade patogênica superior aos microrganismos utilizados atualmente, mantendo-se a mesma especificidade ao organismo alvo.

A presente pesquisa teve como objetivos, selecionar, em condições de laboratório, a eficácia de 27 isolados de *B. thuringiensis*, para o controle de larvas de *Aedes aegypti*; bem como verificar a patogenicidade dos melhores isolados sob diferentes condições abióticas, tais como temperatura e pH e realizar a caracterização genética dos isolados selecionados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA, IMPORTÂNCIA MÉDICA E MÉTODOS DE CONTROLE DE *Aedes Aegypti*

Os insetos da família Culicidae, que agrupa mais de 3.000 espécies, recebem a denominação de mosquitos, pernilongos, muriçocas ou carapanãs, conforme a região. São encontrados desde o Ártico até os mais remotos oásis do deserto, altitudes acima de 5.500 metros a 1.250 metros abaixo do nível do mar (LOZOVEI, 2001). Algumas espécies estão restritas a determinadas regiões, outras, como alguns mosquitos do subgênero *Culex* Linnaeus 1758, são cosmopolitas (FORATTINI, 1962).

Os culicídeos são vetores de agente etiológicos de doenças como: protozoose (malária), viroses (febre amarela, febre dengue, encefalites) e helmintose (filariose bancroftiana). Além da capacidade vetorial, é necessário destacar a perturbação trazida por esses insetos às populações humanas, devido ao hábito hematófago (LOPES, 2002).

Segundo Forattini (1962), Culicidae colonizam tanto criadouros naturais como artificiais, no solo ou em recipientes. O aumento desordenado da população urbana desencadeia problemas no setor habitacional, levando à precariedade das condições de higiene, a falta de infraestrutura básica, entre várias outras situações. Estas condições podem favorecer o aumento populacional do *A. aegypti*, mosquito transmissor do vírus da dengue, conseqüentemente o aumento de casos desta virose, principalmente na região tropical. Lopes (2002) destaca que o descarte pelo homem, de recipientes com capacidade de retenção de água, favorece a procriação de grupos de indivíduos de uma população de mosquitos dotada de plasticidade genética que permite o desenvolvimento nesses criadouros artificiais, sendo esse um passo fundamental para a domiciliação de algumas espécies silvestres, aumentando, em conseqüência, os problemas de saúde pública.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2010), o dengue está presente em mais de 100 países, apresentando uma expansão nas últimas décadas. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão expostas ao risco desta virose. O mesmo órgão estima que ocorra mais de 50 milhões de casos da doença por ano no

mundo. Em 2007, mais de 890.000 casos foram relatados nas Américas, sendo 26.000 casos de febre hemorrágica (WHO, 2010). As principais causas do aumento da dengue durante os últimos anos, foi o crescimento rápido e desorganizado das cidades, industrialização, práticas de estocagem de água, a migração populacional, entre outros (KROEGER *et al.*, 1995; BATRA *et al.*, 2000).

Aedes aegypti é o principal vetor do do vírus da dengue e febre amarela urbana no Brasil e nas epidemias de dengue registradas foi verificada a presença dos três sorotipos do vírus (D1, D2 e D3). É um mosquito sinantrópico, domiciliado, reconhecido por apresentar tegumento e escudo ornamentado com escamas branco-prateadas, formando um desenho em forma de lira na região dorsal do tórax. Têm preferência por colocar os ovos em recipientes artificiais, representados por pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos de xaxins, vasos de cemitério, caixas d`água, tonéis, latões e cisternas abertas, lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados, entre outros (LOPES, 2002). As fêmeas são hematófagas e apresentam concordância gonotrófica, sendo mais ativas a realizarem repastos sanguíneos por ocasião do crepúsculo matutino e vespertino (FORATINI, 2002). Os ovos são colocados principalmente na parede do criadouro, logo acima do nível da água e, em porcentagens menores, podem resistir por mais de um ano contra a dessecação (FORATINI, 2002).

A falta de educação ambiental e consequente aumento do lixo jogados nas ruas ou acumulados no peridomicílio, tem favorecido a proliferação de criadouros desse mosquito nas regiões tropicais, e essas condições tem contribuído com o número de doenças causadas pelo agente etiológico veiculado por esses mosquitos (GUBLER, 1998).

A. aegypti foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (CONSOLI e OLIVEIRA, 1998). Em 1955 tinha sido considerado como erradicado, porém, em 1967 ocorreu a reinvasão na cidade de Belém do Pará, sendo erradicado ainda na década de 1960. No Estado do Rio de Janeiro, o vetor surgiu em 1977 e em Roraima, no início da década de 1980 (CONSOLI e OLIVEIRA, 1998).

Paralelamente à reintrodução de *Ae. aegypti* no país, iniciou-se progressiva propagação do dengue iniciado por Roraima, Rio de Janeiro, Alagoas, Ceará, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, São Paulo, Mato Grosso do Sul e

Tocantins, progredindo para todos os estados brasileiros, com exceção dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (TAUIL, 2002).

De acordo com Kroeger *et al.* (1995), o conhecimento fragmentado sobre a doença, transmissão e prevenção, é um importante fator para falta de ações antrópicas na prevenção da doença. Pelo fato de não haver vacinas ou drogas para o tratamento da dengue, Batra *et al.* (2000) aponta o controle do vetor como a melhor escolha para o combate da doença.

Lozovei (2001) aponta três tipos de controle do inseto, o físico que consiste na eliminação de criadouros e na instalação de telas e mosquiteiros, além dos controles químicos e biológicos.

O controle químico é o mais utilizado no mundo todo e alguns produtos merecem destaque como o Dicloro Difenil Dicloroetano, Methoprene, Diflubenzuron e o mais utilizado, o organofosforado Temephos (CUNHA, 2001; LOZOVEI, 2001). Eles são muito eficientes contra estes insetos vetores, todavia não são específicos, podendo atuar em insetos benéficos, assim como em outros animais, inclusive em humanos. Também podem facilitar o aparecimento de populações resistentes de insetos, diminuindo assim a eficiência dos produtos (VILARINHOS *et al.* 1998; WIRTH *et al.* 2007), conseqüentemente a resistência evidente das populações de insetos (BRAGA *et al.* 2004).

O terceiro tipo de controle, o biológico, parece ser o mais promissor para o controle de vetores e pragas, pois não causam impacto ambiental e é seguro para o homem, (LOZOVEI, 2001).

Dentre as alternativas biológicas os inseticidas à base de bactérias são os mais utilizados e dentre as bactérias destacam-se o *Bacillus sphaericus* e o *B. thuringiensis*, que com as suas inúmeras variedades são os responsáveis por 90-95% do mercado de bioinseticidas (POLANCZK e ALVES, 2003; PRAÇA *et al.*, 2004; WHO, 2010).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE BACILLUS THURINGIENSIS

B. thuringiensis foi descrito em 1915 na Alemanha, isolado a partir de traça de farinha (*Anagasta kuehniella*, Keller 1879). Anteriormente, em 1902, no

Japão, o pesquisador Ishiwata já havia isolado uma bactéria a partir de *Bombyx mori*, que posteriormente se soube ser também uma subespécie de *B. thuringiensis*. A comercialização de produtos a base desta bactéria só se iniciou em 1938 na França, com o bioinseticida comercializado sob o nome de “Sporeine” (VIDAURRE, 1996; MELO-SANTOS *et al.*, 2001; CAPALBO *et al.*, 2004; BRAR *et al.*, 2006; GAMMON *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; OSBORN *et al.*, 2007).

Pertencente à família Bacillaceae, a qual engloba a maioria das espécies formadoras de esporos, *B. thuringiensis* é um bastonete Gram-positivo, com célula vegetativa de 1,0 a 1,2 μ m de largura por 3,0 a 5,0 μ m de comprimento, geralmente móvel. O esporo dessa bactéria possui formato elipsoidal e localiza-se na região central ou paracentral quando no interior da célula mãe. A espécie é aeróbia não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 °C. *B. thuringiensis* apresenta um amplo complexo enzimático, o que lhe permite utilizar uma variedade de substratos. A principal característica que distingue a espécie das outras do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal protéico (HABIB e ANDRADE, 1998; GLARE e O’CALLAGHAN, 2000; MORAES *et al.*, 2001; VILAS-BÔAS *et al.*, 2007).

Devido às suas características fisiológicas como formação de esporos e metabolismo aeróbio não estrito, *B. thuringiensis* apresenta resistência a condições adversas, o que contribui para seu alto potencial no controle biológico (MORAES *et al.*, 1998).

O cristal protéico típico de *B. thuringiensis* é, em geral, produzido durante a esporulação e constitui o principal ingrediente ativo dos bioinseticidas à base dessa bactéria. Este cristal é tóxico para várias espécies de insetos, destacando-se no controle de Lepidóptera, Díptera e Coleóptera. Porém, há subespécies de *B. thuringiensis* que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Hymenoptera, Hemiptera, Ortoptera, Phthraptera e também para alguns nematóides, protozoários e ácaros (SCHNEPF *et al.*, 1998; GLARE e O’CALLAGHAN, 2000; BRAR *et al.*, 2006).

Os cristais de *B. thuringiensis* são formados principalmente por proteínas denominadas Cry, também conhecidas como δ -endotoxinas, e por proteínas citolíticas (Cyt) (BRAVO *et al.*, 2007). Ao final da esporulação, o cristal protéico corresponde a cerca de 20% a 30% do peso seco da célula, sendo liberado no momento da lise celular (GLARE e O’CALLAGHAN, 2000; ARANTES *et al.*,

2002). A Figura 2.1 apresenta esporos e cristais de *B. thuringiensis* liberados com a lise celular, vistos em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes.

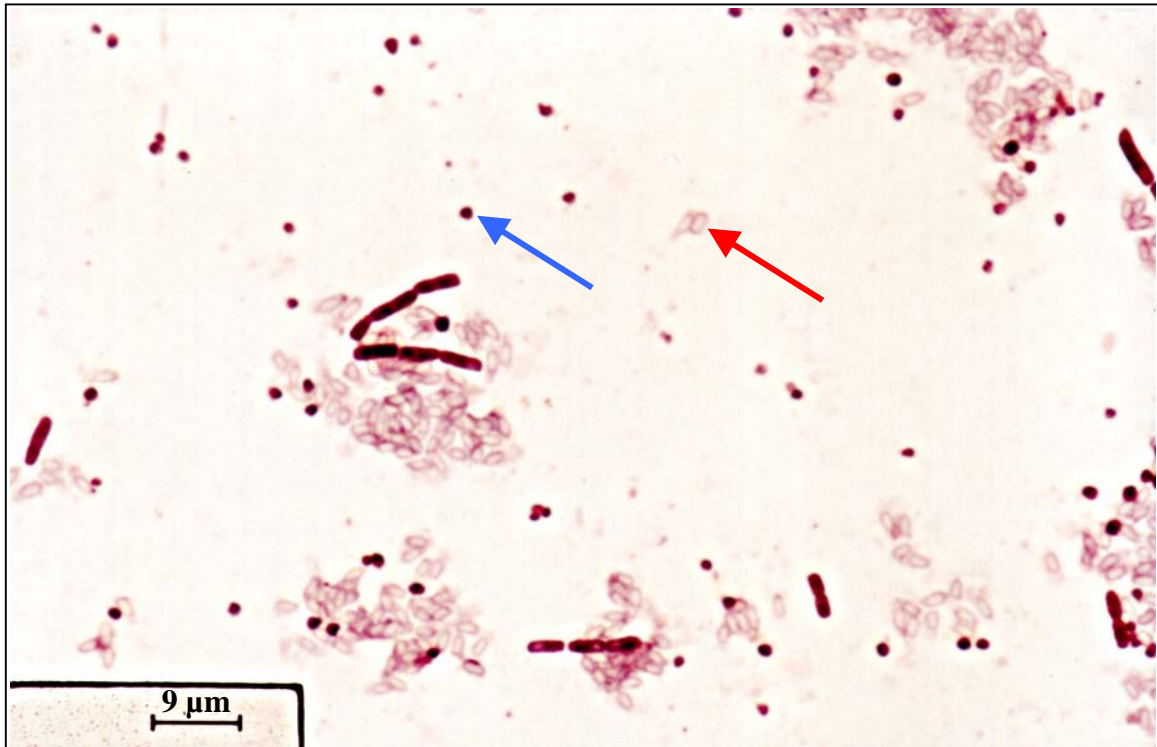


Figura 2.1 – Cultura esporulada de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, evidenciando os esporos elipsóides (seta vermelha) e os cristais protéicos arredondados (seta azul). Aumento de 1000 vezes. Coloração: Amido-Black e Fucsina.

Fonte: Cedido por Dr^a. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas; Laboratório de Bioinseticida / Departamento de Biologia Geral/ Universidade Estadual de Londrina.

Bacillus thuringiensis já foi isolado de diversos ambientes, destacando-se solos, insetos vivos ou mortos, grãos estocados, amostras de água, entre outros. Embora muitos sorotipos tenham sido isolados de amostras de solo, sabe-se que o esporo pode persistir por muito tempo neste ambiente, porém essa bactéria não é capaz de se multiplicar naturalmente no solo ou na água. Pesquisas recentes apontam o inseto como o hábitat de *B. thuringiensis*, pois é principalmente neste ambiente que ocorre sua multiplicação e interações genéticas (VILAS-BÔAS *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.*, 2004; RAYMOND *et al.*, 2008).

O cristal protéico existente no protoplasma celular de *Bacillus thuringiensis* foi descoberto em 1953 por Hannay (LERECLUS *et al.*, 1993; HABIB e ANDRADE, 1986; BRAVO *et al.*, 2007). A proteína Cry, principal constituinte deste

crystal, e a Cyt que caracterizam a espécie, são codificadas por genes que geralmente se localizam em plasmídios e, com menor frequência, no cromossomo bacteriano.

De acordo com a definição mais aceita, uma proteína é considerada Cry quando forma uma inclusão paraesporal (crystal) em *B. thuringiensis*, exibe algum grau de toxicidade a insetos alvos ou apresente seqüência de aminoácidos similar a uma proteína Cry já descrita (SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007). Atualmente estão descritas 64 famílias de proteínas Cry (CRICKMORE *et al.*, 2010).

Durante muito tempo, a nomenclatura das proteínas Cry foi feita de acordo com o inseto-alvo, desta forma, eram classificadas como Cry I as proteínas tóxicas a Lepdoptera, Cry II tóxicas a Lepdoptera e diptera, Cry III contra Coleoptera, Cry IV contra Diptera. Devido às constantes descobertas de novas proteínas Cry, tal sistema mostrou-se inconsistente e, atualmente a classificação é feita baseando-se na seqüência de aminoácidos das proteínas. Periodicamente, o banco de dados on-line sobre proteínas de *B. thuringiensis* atualiza a classificação e nomenclatura de tais proteínas (CRICKMORE *et al.*, 1998; 2010).

Uma mesma subespécie de *B. thuringiensis* pode conter várias cópias de um mesmo gene *cry* ou de genes *cry* diferentes, sendo que as proteínas produzidas por estes genes poderão formar um ou mais cristais (LERECLUS *et al.*, 1993; GLARE e O'CALLANGHAN, 2000). Estas proteínas Cry são sintetizadas na forma de protoxinas, portanto, sua ação depende da ativação, a qual ocorre no inseto. Atualmente, há dois modelos, baseados em dados experimentais, que explicam o modo de ação das toxinas Cry. As primeiras etapas desses dois modelos são idênticas: após a ingestão dos cristais, esses são solubilizados no intestino do inseto, com pH alcalino, liberando as protoxinas que sofrem clivagem por proteases. Ao final dessas etapas, são formadas toxinas ativas, com cerca de 60 a 70% do tamanho da protoxina. A toxina ativa é capaz de ligar-se a receptores específicos presentes nas células das microvilosidades intestinais do inseto (SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007).

O modelo de ação denominado “formação de poros” é o modelo mais antigo para se explicar o modo de ação destas toxinas e parece ser o mais comum entre as diferentes ordens de insetos (Dípteros, Lepidópteros e Coleópteros). Segundo esse modelo, a ligação da toxina com receptores específicos levaria a formação de oligômeros de toxinas, os quais se ligariam a receptores

secundários da membrana da célula intestinal. Como resultado dessa ligação, ocorreria a inserção da toxina oligomérica na membrana da célula epitelial intestinal, resultando em poros nesse epitélio (Fig. 2.2) (HABIB e ANDRADE, 1986; BRAVO *et al.*, 2007; BRAVO e SOBERÓN, 2008).

O modelo mais atual que explica a ação de toxinas Cry é denominado “sinal de transdução” e foi estudado em apenas poucos insetos-alvos. De acordo com esse modelo, a ligação da proteína Cry com receptores específicos, induziria uma série de reações intracelulares, que envolvem a proteína G e a adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A. Todas essas alterações levam a um desequilíbrio da pressão interna celular, danificando-a (Fig. 2.2) (BRAVO E SOBERÓN, 2008).

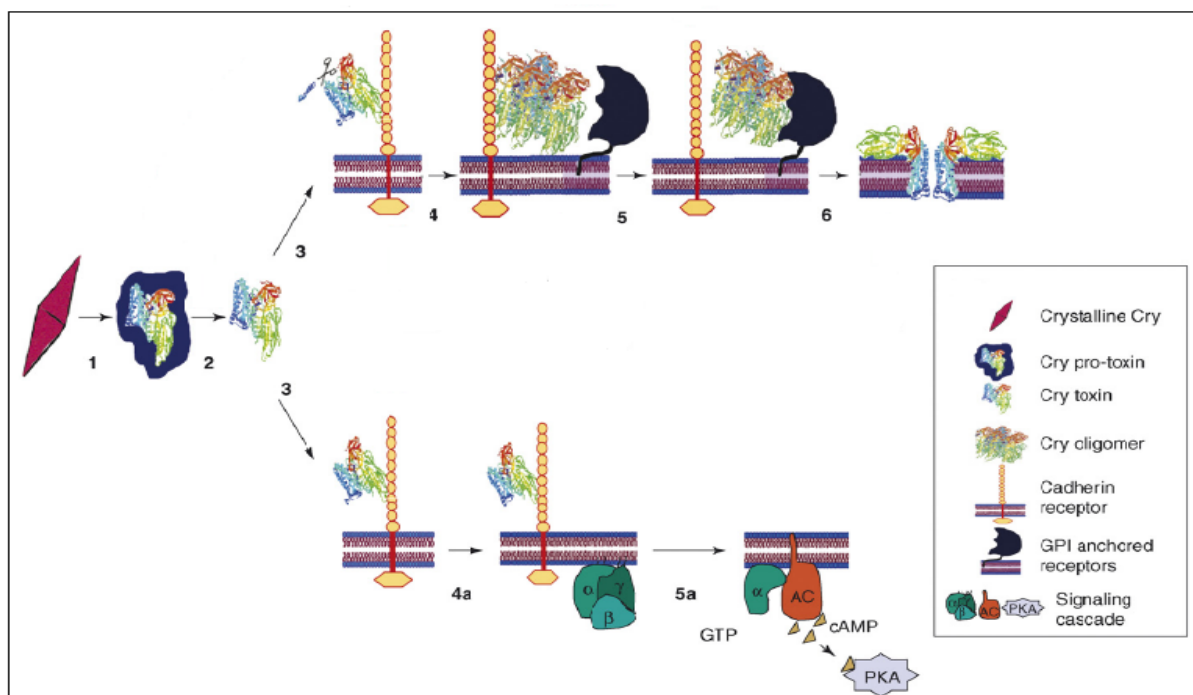


Figura 2.2 – Modos de ação das toxinas Cry. Os passos 1 a 3 são iguais nos dois modelos. O modelo “formação de poros” está representado na porção superior pelos números 4 a 6. A etapa 4 refere-se à oligomerização das toxinas, a 5 à ligação ao segundo receptor e a etapa 6 à inserção da toxina na membrana e formação dos poros. O modelo “sinal de transdução” está representado na porção inferior pelos números 4a e 5a. A etapa 4a refere-se à ligação da toxina ao receptor e estimulação da proteína G, que estimularia a adenilato ciclase (etapa 5a) e após uma série de reações em cascata, comprometeriam o equilíbrio interno **celular**.

Fonte: Bravo e Soberón (2008).

A ação das toxinas, seja por qualquer um dos modelos, resulta na paralisia do aparelho digestório, ocasionando morte por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia (HABIB e ANDRADE, 1986; BRAVO *et al.*, 2007; BRAVO e SOBERÓN, 2008; VALLETE-GELY *et al.*, 2008).

Como grande parte dos genes *cry* localiza-se em plasmídios conjugativos, os sorotipos podem apresentar uma grande combinação de genes, o que resulta na ampla variedade de perfis de toxicidade (LERECLUS *et al.*, 1993; CAPALBO *et al.*, 2004).

A transcrição da maioria dos genes *cry* é dependente do fator sigma, produzido durante o processo de esporulação, por isso a maior parte das proteínas que compõem o cristal é produzida durante essa etapa. Apenas uma pequena parcela de genes *cry* é regulada independentemente da esporulação, sendo, portanto, expressos também durante o crescimento vegetativo. Em ambos os casos, a proteína Cry é fruto do metabolismo secundário (LERECLUS *et al.*, 1993; ARANTES *et al.*, 2002).

A massa molecular das proteínas Cry varia entre 40 e 140KDa. A molécula destas proteínas é globular, formada por três domínios estruturais ligados entre si por pequenas pontes. Até o momento, seis proteínas Cry tiveram suas estruturas bem determinadas por cristalografia de raios-X. Estas proteínas apresentaram um alto grau de similaridade entre seus domínios, o que indica que apresentam um modo de ação bastante similar. O domínio 1 (N-terminal) é formado por cadeias polipeptídicas com formato de α -hélices, sendo uma central (hidrofóbica), cercada por 6 cadeias marginais. O domínio 2 é composto por três cadeias polipeptídicas antiparalelas com formato de β -folha pregueada. Já o domínio 3 apresenta o formato de β -sandwich (BRAVO *et al.*, 2007).

Embora estudos atuais indiquem que várias porções dos diferentes domínios da proteína se insiram na membrana no momento de formação dos poros, acredita-se que o domínio 1 seja o principal responsável pela inserção (NAIR e DEAN, 2008). Os domínios 2 e 3 apresentam similaridades estruturais com cadeias polipeptídicas que se ligam a carboidratos e estariam envolvidos principalmente no reconhecimento de receptores presentes na membrana das células dos insetos-alvo (BRAVO *et al.*, 2007).

As proteínas Cyt fazem parte da inclusão paraesporal de *B. thuringiensis* que apresenta atividade hemolítica. Estas proteínas são formadas por

apenas um domínio, composto por duas cadeias exteriores em forma de α -hélice, e uma cadeia interna em forma de β -folha pregueada. Atualmente são conhecidas 32 proteínas Cyt (CRICKMORE *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007; CRICKMORE *et al.*, 2010).

Assim como as proteínas Cry, as Cyt também são sintetizadas na forma de protoxinas. No interior do inseto, as proteínas Cyt sofrem quebras, liberando a toxina ativa. Ao contrário das proteínas Cry, Cyt não se liga a receptores específicos da membrana celular, e sim, diretamente aos lipídios da membrana. Após sua ligação, as proteínas Cyt induzem a formação de poros ou agem desestruturando a bicamada lipídica das membranas (BRAVO *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado ocorrer um efeito sinérgico entre as proteínas Cry e as proteínas Cyt, ou seja, a maior toxicidade é devida à interação das proteínas, onde uma potencializa o efeito da outra. (ÖSKAN, 2003; BRAVO *et al.*, 2007).

2.3 BACILLUS THURINGIENSIS SUBESP. ISRAELENIS

Algumas espécies de Culicidae classificadas como de importância médica por veicularem patógenos para o homem e outros animais, já apresentam resistência a inseticidas químicos. Durante muito tempo procurou-se uma subespécie de *B. thuringiensis* capaz de controlar com eficiência as populações de Diptera. Em 1976/77, Goldberg e Margalit descreveram a variedade *israelensis* isolada a partir da água de uma lagoa de alta salinidade. Esta subespécie apresentou-se com alto potencial no controle de larvas de algumas espécies de Diptera. Desde então, *B. thuringiensis israelensis* vem sendo aplicado no controle biológico (GOLDBERG e MARGALIT, 1977; BECKER e MARGALIT, 1993; VIDAURRE, 1996; CAPALBO *et al.*, 2004).

Devido ao seu complexo modo de ação, é difícil encontrar dípteros resistentes às toxinas de *B. thuringiensis israelensis*. Esta subespécie tem sido utilizada para controle de culicídeos em vários países da África, nos Estados Unidos, na China, na Alemanha, Brasil e na Austrália (BECKER e MARGALIT, 1993; ÖSKAN *et al.*, 2003; RUSSEL e KAY, 2008).

A segurança ambiental de *B. thuringiensis israelensis* tem sido estudada e numerosos testes com animais não-alvos realizados. Em alguns estudos com mamíferos, por exemplo, fez-se a administração de doses altas de Bti (10^8 bactérias/animal) via subcutânea, oral, intraperitoneal, ocular e por inalação; estes testes revelaram que esta subespécie é inócua para mamíferos. Além desses estudos, o não haver registro de malefícios a outros animais em locais onde produtos com este agente entomopatogênico são utilizados, comprovam sua segurança ambiental. Seu uso é permitido nos Estados Unidos desde 1981 (BECKER & MARGALIT, 1993).

O cristal protéico desta variedade é formado basicamente por variações de proteína Cry e Cyt; em geral, tem forma arredondada, sendo composto principalmente pelas proteínas Cry: Cry4A (125KDa), Cry4B (134KDa), Cry 10 e Cry11A (67KDa).

2.4 TÉCNICA DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem diferenciar isolados, podendo também ser empregados na determinação da presença/ausência dos genes *cry* (PINTO e FIUZA, 2003, POLANCZYK e ALVES, 2003).

Com a caracterização genética, é possível discriminar isolados de *B. thuringiensis* (FRUTOS *et al.*, 1994). São conhecidas várias aplicações da tecnologia do DNA recombinante no controle biológico de insetos, sendo que a maioria dos exemplos provém de bactérias, principalmente empregando *B. thuringiensis* e espécies correlatas (AZEVEDO, 1998). A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam

complementares a seqüências específicas que ligam-se a região alvo (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

A técnica de PCR permite comparar geneticamente, isolados pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (LIMA *et al.*, 2002; PORCAR e JUARÉZ-PÉREZ, 2003), o que a torna uma ferramenta de trabalho indispensável. É uma forma de caracterizar isolados de *B. thuringiensis* e é amplamente utilizada na detecção de genes *cry* em novas linhagens de bactérias (VALICENTE *et al.*, 2000; HANSEN e HENDRIKSEN, 2001; VILAS BOAS e LEMOS, 2004) onde os “primers” podem ser desenhados a partir de regiões conservadas destes genes.

Carozzi *et al.* (1991) utilizaram a técnica de PCR para identificar cepas de *B. thuringiensis* com atividade inseticida contra lepidópteros, coleópteros e dípteros, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry1*, *cry3* e *cry4*. Trabalhos semelhantes têm sido realizados ao redor do mundo para caracterizar o perfil genético das cepas de *B. thuringiensis*, prever a atividade inseticida das toxinas Cry e descobrir novos genes (MASSON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003; VILAS BOAS e LEMOS, 2004).

A técnica requer quantidades pequenas de DNA na ordem de picogramas, e permite uma rápida e simultânea caracterização de muitas amostras. Todavia, o procedimento normal de PCR não pré-determina exatamente a atividade inseticida do isolado, assim como outros fatores, como, por exemplo, o nível de expressão dos genes *cry* presentes que estão envolvidos no potencial inseticida de cada isolado (MARTINEZ *et al.*, 2005). A avaliação da patogenicidade é um passo importante na seleção de novos isolados, fazendo-se necessário, os testes de bioensaios utilizando o entomopatógeno *B. thuringiensis* contra o inseto-alvo.

Baseado nesta técnica, Bravo *et al.* (1998), realizaram uma caracterização de genes *cry* oriundos de amostras de bactérias isoladas em solo do mexicano, obtendo-se um número de isolados com evidente potencial entomopatogênico para as ordens Diptera e Lepdoptera.

Ibarra *et al.* (2003), em estudo de diversidade de linhagens de *B. thuringiensis* em amostras da América Latina, encontrou vários isolados com elevado potencial entomopatogênico como as linhagens LBIT315, LBIT348 e IB604 que apresentaram uma atividade letal de três vezes maior do que a linhagem padrão utilizada, quando testadas em larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

2.5 PRODUÇÃO DE *B. THURINGIENSIS*

As primeiras indústrias a demonstrarem interesse no estudo e comercialização de *B. thuringiensis* foram empresas de fermentação. Logo as indústrias de produtos químicos perceberam a importância deste mercado de controle biológico e se lançaram em sua pesquisa e produção (CAPALBO e MORAES, 1988).

Nas décadas de 1970 e 1980, com o isolamento de novas linhagens e a possibilidade da manipulação gênica, o interesse por *B. thuringiensis* aumentou bastante, principalmente no setor privado (ARANTES *et al.*, 2002; CAPALBO *et al.*, 2004).

Em geral, os produtos à base de *B. thuringiensis* são compostos por uma mistura de cristais, esporos, poucas células vegetativas e ingredientes secundários da formulação (CAPALBO *et al.*, 2004).

Normalmente, a produção de *B. thuringiensis*, assim como de outros produtos microbianos, envolve as seguintes etapas: seleção da linhagem, estocagem, processo fermentativo, recuperação do princípio ativo (esporos e cristais), formulação do produto e análise da qualidade (COUCH, 2000; MORAES *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2007). Segundo Couch (2000) os principais critérios para seleção de uma subespécie bacteriana para produção de bioinseticidas são: espectro de ação, potência por unidade de volume da cultura, requerimentos nutricionais, facilidade de produção, estabilidade genética e facilidade de estocagem.

A estocagem apropriada da cepa multiplicadora é de grande importância, pois a linhagem deve conservar seu potencial tóxico e velocidade de crescimento. No caso de *B. thuringiensis*, as trocas de plasmídios ocorrem com certa frequência e há relatos de perda de toxicidade após sucessivas fermentações, sendo essencial a constante busca por novas linhagens e o monitoramento durante o processo de fermentação (COUCH, 2000; BIZARRI *et al.*, 2008).

A forma mais comum de produção de *B. thuringiensis* é por fermentação submersa (líquida) descontínua, também conhecida como processo em batelada. Nesta fermentação, um recipiente contendo meio de cultura líquido é inoculado com o microrganismo, não havendo acréscimo ou retirada significativa do

meio fermentado. Portanto, ocorre todo o desenvolvimento da cultura, sendo retirado o produto apenas no final do processo. Em geral, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* são formadas no fim da fermentação, quando as condições do meio se tornam desfavoráveis, sendo o processo em batelada satisfatório para tal produção (MORAES *et al.*, 2001).

Alguns pesquisadores têm estudando as fermentações sólida, contínua e em batelada alimentada, porém até o momento, o mais viável para produção de proteínas Cry ainda é o processo em batelada submersa (VALLEJO *et al.*, 1999; MORAES *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003,).

Na fermentação industrial os passos a serem seguidos são: pré inóculo, geralmente feito em frascos pequenos, préfermentador, comumente com 1/5 do volume da fermentação e o fermentador final. Durante todas as etapas deve-se analisar a cultura quanto à contaminação, características morfológicas e potencial entomopatogênico. Em geral, os reatores utilizados permitem o controle das condições principais de cultivo, principalmente temperatura, pH, aeração e agitação. O preinóculo, prefermentado e o fermentado, em volumes crescentes, são feitos a fim de diminuir o tempo da fase *lag*, ou seja, o período de adaptação do microrganismo às condições de cultivo. Em geral, prefermentado e fermentado possuem os mesmos ingredientes no meio de cultivo. É importante limitar a quantidade de passos no processo de produção a fim de evitar contaminações e mudanças indesejáveis no comportamento da bactéria (COUCH, 2000; MORAES *et al.*, 2001).

Ao final da fermentação, a cultura de *B. thuringiensis* apresenta em média 6 a 8% de sólidos, dos quais 1 a 3% são cristais e esporos. Há vários métodos que podem ser utilizados para a recuperação destes cristais e esporos, sendo o mais comum a centrifugação e a micro-filtração. É importante ressaltar que tais processos permitem a recuperação principalmente das proteínas Cry; muitas outras toxinas que podem contribuir para a toxicidade final do produto são perdidas. Atualmente novas técnicas de recuperação e/ou concentração do produto estão sendo desenvolvidas para complementar as mais utilizadas, destacando-se a liofilização e a flotação (COUCH, 2000; BRAR *et al.*, 2006;).

Após a recuperação dos metabolitos de interesse, os produtos são formulados. No caso dos bioinseticidas, a formulação tem por objetivo conferir estabilidade ao produto durante a estocagem e aplicação, facilitar a aplicação do

produto e proteger o microrganismo das condições adversas do ambiente. Há dois tipos básicos de formulação, sólida e líquida. Em geral, as formulações sólidas são mais estáveis e preferíveis (COUCH, 2000; BRAR *et al.*, 2006). Embora sejam segredos industriais, os produtos formulados geralmente contam com uma combinação de aditivos reconhecidos pela FDA (Food and Drug Administration) ou pelo órgão competente do país. É comum o uso de dispersantes, protetores e surfactantes (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000; BRAR *et al.*, 2006).

Antes de ser comercializado, o produto formulado deve passar por testes de análise de qualidade que atestem principalmente sua potência tóxica. Para *B. thuringiensis*, a toxicidade é geralmente analisada por meio de bioensaio com o inseto-alvo (COUCH, 2000).

No Brasil, estudos realizados por diversos grupos em diferentes regiões têm tentado implantar centros biotecnológicos para a produção de produtos à base de *B. thuringiensis*. Atualmente, tais centros estão em fase de estabelecimento dos métodos de produção e execução dos testes preliminares. Como exemplos destes centros podem-se citar a Probiom Tecnologia, situada na cidade de Campinas (São Paulo) e Bioticom, situada em Recife (Pernambuco). A empresa Bthek Biotecnologia Ltda., com sede em Brasília, foi a primeira a formular e comercializar um produto nacional à base de *B. thuringiensis israelensis*.

Os produtos encontrados no mercado são de difícil acesso aos consumidores, quer pelo preço, pela falta de informação ou devido às condições legais estabelecidas pelo país. O desenvolvimento de produções locais pode ser uma solução para tal situação. Neste caso, a produção pode ser feita em um volume menor, escala piloto, utilizando-se materiais alternativos e abundantes na região a ser atendida (SALAMA e MARGALIT, 1993; MORRIS *et al.*, 1997).

2.6 BIOENSAIO

Um dos parâmetros mais importantes no estudo com *B. thuringiensis* é o seu potencial tóxico ante o inseto-alvo. Embora muitos estudos utilizem a quantificação de proteínas Cry para aferir a toxicidade de uma produção, sabe-se que o bioensaio é um método mais sensível, pois fornece indícios não só

quantitativos, mas também da eficácia da toxicidade da produção. Liu e Tzeng (1998) indicam em seu trabalho a utilização do bioensaio na otimização de produções, pois apenas contagem de esporos ou quantificação de proteínas não foram suficientes.

O bioensaio pode ser entendido como um teste onde seres vivos são expostos a uma determinada substância, sob condições controladas. No caso de *B. thuringiensis*, o bioensaio é feito com larvas de insetos alvos segundo protocolos da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MORAES, *et al.*, 2001; WHO, 2005).

Para *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, o teste é feito com larvas de dípteros dos gêneros *Aedes*. Nesse ensaio, larvas entre terceiro ou quarto instar são colocadas em diferentes recipientes, nos quais são aplicadas diferentes concentrações do produto. O experimento é mantido a 25-28 °C por um período de 24 horas, quando então são mensuradas as quantidades de larvas mortas em cada uma das concentrações. Faz-se então um cálculo da concentração letal para 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das larvas por meio de uma regressão linear log-probit, a qual pode ser feita com o uso de programas de computador adequados. O bioensaio é feito em triplicata e há um controle negativo, no qual não é aplicado o produto. Em alguns casos, como por exemplo, no estudo de novas linhagens, padroniza-se uma concentração para as diferentes linhagens, aplica-se a cultura e, posteriormente, realiza-se o bioensaio completo. Esse teste incompleto tem como objetivo fazer uma triagem inicial de novas linhagens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O bioensaio pode ser expresso também em termos de Unidades Internacionais (ITU), nesse caso, a CL₅₀ do produto em teste é comparada com o bioensaio de uma cepa de padrão internacional a qual foi atribuída um valor arbitrário de potência. Para *B. thuringiensis israelensis*, a cepa padrão é a IPS82, cuja potência contra *A. aegypti* é de 15000 ITU/mg (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Muitos fatores podem influenciar um bioensaio, destacando-se a espécie de inseto, o instar, a densidade de larvas, qualidade da água e a temperatura, desse modo é crucial a padronização do teste. Estudos revelam que *A. aegypti* é uma das espécies mais sensíveis à *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, isto ocorre devido a fatores intrínsecos dessa espécie, tais como sua alta velocidade de filtração da água (JARIC'-PERKUSIC *et al.*, 2008; OTIENO-AYAYO *et al.*, 2008).

3 REFERÊNCIAS

- ADAMS, T.T.; EITEMAN, M.A. & HANEL, B.M. Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. **Bioresearch Technology**, Miramar, v.82, n.1, p.33-41, mar. 2002.
- ARANTES, O.M.N.; VILAS-BOAS, L.A. & VILAS-BOAS, G.F.L.T. 2002. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: SERAFIN, L.A.; BARROS, N.M. & AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria**. 2.ed. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. p.269 - 293.
- ARAÚJO, A.P.; MELO-SANTOS, M.A.V.; CARLOS, S.O.; RIOS, E.M.M.M.; REGIS, L. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**. Washington, v.41, n.3, p.339-347, jun. 2007.
- AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.239-268.
- BATRA, C.P.; MITTAL, P.K.; ADAK, T. Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* formulation. **Journal of American Mosquito Control Association**. Mount Laurel, v.16, n.4, p.321-323, dez. 2000.
- BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* again mosquitoes and black flies. In: ENTWISTLE, P.F. *et al.* (Ed) **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. 1ed. Wiley, 1993. p.147-170.
- BIZARRI, M.F.; BISHOP, A.H.; DINSDALE, A. & LOGAN, N.A. Changes in the properties of *Bacillus thuringiensis* after prolonged culture in a rich medium. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, n.1, p.60-9, jan. 2008.
- BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SILVA, S.S. & VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.99, p.199-203, jan. 2004.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D. & VALÉRO, J.R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, Kansas, v.41, n.2, p.323-342, fev. 2006.
- BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Cuernavaca, México, v.49, n.2, p.423-435, abr. 2007.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p.4965-4972, dez. 1998.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.26, n.10, p. 573-579, out. 2008.

CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. Aspectos da produção de *Bacillus thuringiensis*. In: **Anais do congresso brasileiro de entomologia, Campinas**. 1.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p70-80.

CAPALBO, D. M. F.; BOAS, G.T.V.; ARANTES, O.N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (ed.). **Biocnologia e meio ambiente**. 1.ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p.309-350.

CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p. 3057-3061, nov.1991.

CHEN, S.; HONG, J.Y. & WU, W.T. Fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.30, n.12, p.677-681, dez. 2003.

CONSOLI, R.A.G.B. & OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998. 225 p.

COUCH, T.L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (org) **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications**. Kluwer: Academic Publishes, 2000. p.297-316.

CRICKMORE, N. *et al.* 2010. "**Bacillus thuringiensis** toxin nomenclature" Disponível: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 24 fev. 2010

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. & DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology review**, Washington, v.62, n.3, p. 807-813, set. 1998.

CUNHA, M.C.I. Culicídeos. In MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, p. 31-47, 2001.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, New York, v.37, p. 409-433, dez. 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargen**, Brasília, 3.ed, 1998., 222p.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. 1.ed. São Paulo: EDUSP, 2002. 864p.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. 1.ed. São Paulo, USP, 1962. 662p.

FRUTOS, R.; FEDERICI, B.A.; REVET, B.; BERGOIN, M. Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.63, n.3, p.294-300, mai. 1994.

GAMMON, K.; JONES, G.W.; HOPE, S.J.; OLIVEIRA, C.M.F.; REGIS, L.; SILVA FILHA, M.H.N.L.; DANCER, B.N.; BERRY, C. Conjugal transfer of a toxin-coding megaplasmid from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* to mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.72, n.3, p.1766-1770, mar. 2006.

GLARE, T. R. & O'CALLAGHAN. ***Bacillus thuringiensis* Biology Ecology and Safety**_Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 350 p.

GLUBER, D.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, p.480-496, jul. 1998.

GOLDEBERG, L.J.; MARGALIT J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex uinivatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, Washington, v.37, p.355-358, ago. 1977.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (coord). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1998. p.383-446.

HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington DC, v.67, n.1, p.185-189, jan. 2001.

HOFTE, H.; WHINTELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and molecular biology review**, Washington. v.3, n.2, p. 242-255, jun. 1989.

KROEGER, A.; DEHLINGER, U.; BURKHARDT, G. ATEHORTUA, W.; ANAYA, H.; BECKER, N. Community based dengue control in Columbia: people's knowledge and practice and the potential contribution of the biological larvicide Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*). **Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.46, n.4, p.241-246, dez. 1995.

IBARRA, J.E.; DEL RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NOIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; DE OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.9, p.5269-5274, set. 2003.

JARIC´PERKUSIC, D.; HACKENBERGER, B.K.; STEPIC, S. & MERDIC, E. Influence of Molting on Efficacy of Two Functionally Different Larvicides: *Bti* and *Temephos*. **Journal of Economic Entomology**, Califórnia, v.101, n.4, p. 1204-1210, ago. 2008.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (ed) ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Wiley & sons, 1993. p.37-70.

LECADET, M.M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V.C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P. & THIÉRY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, n.4, p. 660-672, dez. 1999.

LIMA, A.S.G.; GUIDELLI, A.M.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. Identification of new isolates de *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxins electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p.225-229, mai. 2002.

LI, M.S.; JE, Y.H.; LEE, I.H.; CHANG, J.H.; ROH, J.Y.; KIM, H.S.; OH, H.W.; BOO, K.S. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. Kurstaki containing a new δ – endotoxin gene. **Current Microbiology**, New York, v.45, n.4, p. 299-302, set. 2002.

LIU, B-L; TZENG, Y-M. Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**. Heidelberg, v.18, n.6, p.413-418, jun. 1998.

LOPES, J.; ZEQUI, J.A.C.; NUNES, V.; OLIVEIRA, O.; NETO, B.P.O. & RODRIGUES, W. Immature Culicidae (Diptera) collected from the Igapó lake located in the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n. 4, p.465-471, set. 2002.

LOZOVEI, A.C. Culicideos (mosquitos). In – MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**, 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.59-103.

MARTÍNEZ, C.; IBARRA, J.E.; CABALLERO, P. Association analysis between setoptype, Cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.90, n.3, p.91-97, nov. 2005.

MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUÁREZPÉREZ, V.; FRUTOS, R. Aholistic approach for detection the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p.4782-4788, dez. 1998.

MELO-SANTOS, M.A.V. Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, Dissertação, 2001, 74 p.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D.M.F.; ARRUDA, R.O.M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle microbiano de insetos**. 1 ed. Piracicaba: Manole, 1998. p.815-844.

- MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. & ARRUDA, R.O.M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BOZARNI, W. & SCHMIDELL, W. (org.) **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 3.ed. Porto Alegre: Edgar Blücher, 2001. p.245-265.
- MORRIS, O. N.; KANAGARATNAM, P.; CONVERSE, V.V. Suitability of 30 agricultural products and by-products as nutrient sources for laboratory production of *Bacillus thuringiensis* subesp. *aizawai* (HD133). **Journal of invertebrate pathology**, New York, v.70, n.2, p.113-120, fev. 1997.
- NAIR, M.S.; DEAN, D.H. All Domains of Cry1A Toxins Insert into Insect Brush Border Membranes. **The Journal of Biological Chemistry**. Bethesda, v.283, n.39, p.26324–26331, set. 2008.
- OSBORN, F.R.; HERRERA, M.J.; GÓMEZ, C.J. & SALAZAR, A. Comparison of two commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) at three salt concentrations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.102, n.1, p.69-72, fev. 2007.
- ÖSKAN, M.; DILEK, F.B.; YETIS, U. & OZCENGİZ, G. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, n.1, p.49-53, jan. 2003
- OTIENO-AYAYO; ZARITSKY, A.; WIRTH, M.C.; MANASHEROB, R.; KHASDAN, V.; CAHAN, R. & BEN-DOV, E. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.10, n.9, p. 2191-2199, set. 2008.
- PINTO, L.M.N. & FIUZA, L.M. PCR and bioassays screening of *Bacillus thuringiensis* isolates from rice fields of Rio Grande Do Sul specific to lepidopterans and coleopterans **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n.4, p.305-310, dez. 2003.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideu, v.7, n.2, p. 1-10, abr. 2003.
- PORCAR, M. & JUÁREZ-PÉREZ. PCR-based identification of *B. thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology**, Europa, v.26, n.5, p.419-132, jan. 2003.
- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *B. thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.
- RAYMOND, B.; ELLIOT, S.L & ELLIS, R.J. Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.98, n.3, p.307-313, jul. 2008.
- RUSSEL, T.L.; KAY, B.H. Biologically based insecticides for the control of immature Australian mosquitoes: a review. **Australian Journal of Entomology**. Australia, v.47, n.3, p.232–242, ago. 2008.

SALAMA, H.S.; MARGALIT, J. The use of *Bacillus thuringiensis israelensis* in development countries. In ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J. & HIGGS, S. (eds) ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Wiley, 1993. p.237-254.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN-RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.3, p. 775-806, set. 1998.

SUZUKI, M.T.; LERECLUS, D.; ARANTES, O.M.N. Fate of *Bacillus thuringiensis* in different insect larvae. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.50, n.11, p.973-975, nov. 2004.

TAUIL, PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.18, n.3, p. 867-71, mai. 2002.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PAIVA, E. PCR. Identification of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* strains that are efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.1, p. 147-153, mar. 2000.

VALLEJO, F.; GONZÁLES, A.; POSADA, A.; RESTREPO, A. & ORDUZ, S. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture. **Biotechnology techniques**, Colombia, v.13, n.4, p.279-281, abr. 1999.

VALLETE-GELLY, I.; LEMAITRE, B. & BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defenses. **Nature reviews: Microbiology**, New York, v.6, n.6, p.302-313, abr. 2008.

VIDAURRE, T.J.C. Estudos de otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de nova linhagem de "*Bacillus thuringiensis*". **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 136p.

VILARINHOS, P.T.R.; DIAS, J.M.C.S.; ANDRADE, C.F.S.; ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 1.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 447-480.

VILAS-BÔAS, G.T.; PERUCA, A.P. & ARANTES, O.M. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.53, n.6, p.673-687, jun. 2007.

VILAS-BÔAS, G.T.; LEMOS, M.V.F. Diversity of genes *cry* and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.50, n.8, p.605-613, jul. 2004.

VILAS-BÔAS, LA.; VILAS-BÔAS, G.F. SARIDAKIS, H.O.; LEMOS, M.V.; LERECLUS, D. & ARANTES, O.N. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in soil microcosm. **FEMS Microbiology Ecology**, Europa, v.31, n.3, p.255-259, mar. 2000.

ZHANG, B.; LIU, M.; YANG, Y.; YUAN, Z. Cytolytic Toxin Cyt1Aa of *Bacillus thuringiensis* Synergizes the Mosquitocidal toxin Mtx1 of *Bacillus sphaericus*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. n.70, n.9, p.2199-2204, out. 2006.

WANG, J.; BOETS, A.; VAN-RIE. J.; REN, G. Characterization of *cry 1*, *cry 2*, and *cry 9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.82, n.1, p.63-71, jan. 2003.

WIRTH, M.C.; GEORGHIOU, G.P. Cross-resistance among CryIV toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae). **Insecticide resistance and Resistance Management**. v.90, n.6, p. 1471-1477, dez. 1997.

WIRTH, M.C.; YANG, Y.; WALTON, W.E.; FEDERICI, B.A.; BERRY, C. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n.73, p.6066-6071, out. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. 13.ed. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005. 2005, 39p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010. Impact of dengue, 1: 1. Disponivel em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>> acesso em 29/06/10>.

4 ARTIGO A**PROSPECÇÃO DE NOVAS LINHAGENS DE *BACILLUS* COM POTENCIAL
UTILIZAÇÃO PARA CONTROLE DE *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762)
(DIPTERA: CULICIDAE)**

**PROSPECÇÃO DE NOVAS LINHAGENS DE *BACILLUS* COM POTENCIAL
UTILIZAÇÃO PARA CONTROLE DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)
(DIPTERA: CULICIDAE)**

Resumo

Aedes aegypti (Linnaeus), principal vetor do vírus da febre dengue no Brasil. Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* tem apresentando resultados satisfatórios no controle de dípteros, devido à produção de proteínas bioinseticidas denominadas Cry e Cyt. O presente trabalho objetivou a seleção de isolados de *B. thuringiensis*, portadores de genes *cry* e *cyt* com alta eficiência no controle de *A. aegypti*. Uma coleção de 27 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diversas regiões brasileiras, foi submetida à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com base nos iniciadores específicos para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*. Os isolados dípteros-específico foram avaliados quanto à característica genética e através de bioensaios seletivos, para determinação da CL₅₀ e CL₉₅. De 27 isolados, cinco apresentaram mortalidade de 100% das larvas a uma concentração de 0,05ppm. Estes isolados em bioensaios com variação de temperatura, não apresentaram diferença significativa quando submetidos as temperaturas de 15, 25 e 35°C. Nos testes de variação de pH, houve uma redução na eficácia quando as condições da água do bioensaio eram próximas da neutralidade ou até mesmo da alcalinidade. Todos os isolados caracterizados geneticamente, apresentaram os genes Díptero-específico. Os resultados obtidos permitiram a seleção de isolados que poderão ser utilizados em formulações de novos bioinseticidas, podendo contornar possíveis problemas de resistência.

Palavras-chave: Controle biológico. Resistência. PCR. Díptera. Dengue.

Abstract

aedes aegypti (Linnaeus, 1762), main vector of dengue fever in Brazil. Bt-based bioinsecticides have adequately controlled Diptera due to production of the bioinsecticidal proteins Cry and Cyt. Our research aimed at the selection of isolates of *B. thuringiensis*, carriers of genes Cry and Cyt with high efficiency in controlling *A. aegypti*. A collection of 27 isolates of *B. thuringiensis* collected from several Brazilian regions was submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR), based on specific primers for genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, and *cyt2Aa*. The Diptera-specific isolates were evaluated for their genetic characteristics and by selective bioassays to determine CL₅₀ CL₉₅. Five of the 27 isolates had 100% larval mortality at 0.05ppm concentration. In bioassays at varied temperatures, no significant isolates differences were observed at 15, 25 or 35°C. Lower efficiency was observed in pH variation tests when the bioassay water was near neutrality or alkalinity. All genetically characterized isolates contained Diptera-specific genes. Our results allowed for the selection of isolates that can be used in formulations of new bioinsecticides, to overcome resistance problems.

Key – cwords: Biological control. Resistance. PCR. Diptera. Dengue.

4.1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é responsável pela manutenção do ciclo virótico da febre dengue e febre amarela, em áreas urbanas e, no Brasil, em particular, é considerada a única a transmitir estes patógenos (MELO-SANTOS, 2001).

Uma das formas de controle deste vetor envolve o uso de controle biológico, que consiste em utilização de produtos cujo princípio ativo são microrganismos, que podem ser aplicados de maneira similar a um inseticida químico (MELO e AZEVEDO, 1998). Dentre as bactérias que possuem atividade entomopatogênica, o uso do *Bacillus thuringiensis* vem ganhando espaço anteriormente dedicado aos inseticidas químicos. É uma bactéria Gram-positiva que tem a capacidade de produzir, durante o processo de esporulação, uma inclusão protéica denominada δ -endotoxina (proteínas Cry). Diferentes variedades desta espécie produzem diferentes tipos de cristais que são altamente específicos para diferentes ordens de insetos (HABIB e ANDRADE, 1998).

Por ser um microrganismo promissor, diversos laboratórios em todo o mundo buscam novos isolados de *B. thuringiensis* que produzam diferentes toxinas ou que estejam mais adaptados às condições locais, para que tenham melhor eficácia em campo e possam ser usados no manejo da resistência de insetos (MONNERAT e BRAVO, 2000). As propriedades entomopatogênicas desta bactéria têm impulsionado pesquisas para selecionar isolados de *B. thuringiensis* com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos (SCHNEPF *et al.*, 1998; ARANTES *et al.*, 2002; PINTO e FIUZA, 2003; PRAÇA *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2007).

A busca por novos isolados com atividade contra espécies de dípteros pode ter um impacto sobre o controle de mosquitos de todo o mundo, pois estudos como estes possibilitam a descoberta de novas alternativas de controle de determinados vetores, como verificado no trabalho de Ibarra *et al.* (2003) que, em um estudo de diversidade de linhagens de *B. thuringiensis* em amostras de solo da América latina, encontraram vários isolados com elevado potencial entomopatogênico, que apresentaram uma atividade letal de três vezes maior do

que a linhagem padrão utilizada, quando testadas em larvas de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* Say 1823.

As proteínas Cry produzidas pelo *B. thuringiensis*, com ação bioinseticida são codificadas por genes que podem estar localizados no cromossomo ou em grande plasmídios (40-200MDa) ou concomitantemente em ambos (GONZÁLES *et al.*, 1982; LERECLUS *et al.*, 1993). Existe cerca de 509 sequências de genes *cry* que foram determinadas e classificadas em 64 famílias e diferentes subclasses (CRICKMORE *et al.*, 2010).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* está sendo estudada, principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Estas técnicas apresentam aplicações práticas, tais como a previsão da especificidade tóxica de uma linhagem através da determinação do conteúdo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes pouco conhecidos e, direcionando os trabalhos de bioensaio (CAROZZI *et al.*, 1991; BRAVO *et al.*, 1998; IBARRA *et al.*, 2003; OTIENO-AYAYO *et al.*, 2008).

Em todo mundo, muitos programas de isolamento de *B. thuringiensis* têm encontrado este microrganismo distribuído em uma ampla gama de ambientes. Linhagens foram isoladas principalmente a partir de amostras de solo (BRAVO *et al.*, 1998; PINTO e FIUZA, 2003; VILAS-BÔAS e LEMOS, 2004; JOUZANI *et al.* 2008), de insetos vivos ou mortos (BERNHARD *et al.*, 1997; CHAUFoux *et al.*, 1997) e grãos estocados (BERNHARD *et al.*, 1997), bem como de outras fontes alternativas como do filoplano (SMITH e COUCHE, 1991; DAMGAARD *et al.*, 1998) e a partir de amostras de águas de rios e lagos (MEADOWS, 1993).

A presente pesquisa objetivou selecionar isolados bacterianos e determinar a CL₅₀ e CL₉₅ em diferentes condições de temperatura e pH, bem como a caracterização genética de linhagens de *Bacillus thuringiensis* que apresentaram eficiência na mortalidade de larvas de *A. aegypti*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Linhagens Bacterianas

Foram analisados 27 isolados de *B. thuringiensis*, originários de amostras de solo e grãos armazenados, depositados no Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina (Tabela 4.1). Material liofilizado da linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis* IPS82, cedido pelo Laboratório de Bioinseticida do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, foi utilizado como controle positivo em todos os bioensaios.

4.2.2 Produção de Esporos e Cristais

Isolados de *B. thuringiensis* estocados em papel de filtro contendo esporos e cristais foram recuperados após imersão dos papéis em 1 ml de água destilada esterilizada, seguida de breve agitação. Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio Bacto-Peptona (BP) (LECADET *et al.*, 1980). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C até completa esporulação, a qual foi monitorada em microscópio óptico após cinco dias de incubação.

Os isolados selecionados para a realização dos testes foram cultivados em 600mL de meio NYSM (YOUSTEN, 1984), por 72 h a 30 °C, sendo submetidos à 250 rpm de agitação. Em seguida, as culturas de cada isolados foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C, o precipitado foi congeladas por aproximadamente 16 h e liofilizadas por 18 h.

Tabela 4.1 – Origem dos isolados de *B. thuringiensis* utilizados nos bioensaios para se determinar a toxicidade sobre larvas de *Aedes aegypti*.

ISOLADOS	LOCAL DA AMOSTRA	TIPO DA AMOSTRA	DATA DE COLETA
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD 1	Padrão Internacional (Controle negativo)	-	-
BR 06	Londrina	Solo	02/1990
BR 07	Londrina	Solo	11/2002
BR 12	Londrina	Solo	03/1990
BR 14	Londrina	Solo	02/1990
BR 18	Londrina	Solo	01/1990
BR 26	Pantanal/ MS	Solo	03/1991
BR 27	Pantanal/ MS	Solo	03/1990
BR 33	Maravilha/Pr	Solo	01/1991
BR 34	Maravilha/Pr	Solo	01/1991
BR 35	Jaboticabal/SP	Grãos armazenados	09/1991
BR 36	Ijaci/MG	Solo	09/1991
BR 37	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	09/1991
BR 38	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	09/1991
BR 40	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	09/1991
BR 41	Cotia/SP	Solo	09/1991
BR 42	Ijaci/MG	Solo	09/1991
BR 44	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	09/1991
BR 46	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	09/1991
BR 53	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	01/1990
BR 58	Sertanópolis/PR	Grãos armazenados	01/1990
BR 64	Cotia/SP	Solo	12/2002
BR 65	Londrina/PR	Grãos armazenados	12/2002
BR 78	Londrina/PR	Grãos armazenados	07/1992
BR 79	Londrina/PR	Grãos armazenados	07/1992
BR 83	Londrina/PR	Grãos armazenados	04/1992
BR 87	Londrina/PR	Grãos armazenados	04/1992
BR 136	Londrina/PR	Solo	10/2007

4.2.3 Bioensaios

Para a realização dos bioensaios, foi mantido durante todo o período de execução um insetário de *Ae. aegypti*. A criação teve início com a coleta de ovos em campo, utilizando-se armadilhas ovitrampa. Larvas de 4º estágio inicial foram utilizadas nos bioensaios, sendo que nenhum alimento foi adicionado nas bandejas de criação 24 horas antes dos testes.

O método utilizado para os bioensaios foi baseado no Draft (1999) *Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use da OMS* e Lacey (1997), com repetições em dias diferentes. Vinte e cinco larvas de 4º estágio

inicial foram transferidas para potes de polietileno circular transparente de 11 cm de diâmetro e 7 cm de profundidade, contendo 150 mL de água destilada.

Inicialmente foram realizados os bioensaios em temperatura ambiente com três concentrações diferentes do isolado em teste: 10 ppm; 1 ppm e 0,1 ppm, sendo três repetições em dias diferentes. Neste teste foram analisados 27 isolados de *B. thuringiensis* para seleção dos 10 melhores isolados baseando-se na mortalidade apresentada. Na segunda fase, os 10 isolados selecionados foram bioensaiados nas concentrações de 0,1 ppm, 0,06 ppm e 0,05 ppm, também em três repetições, para seleção dos cinco com maior toxicidade para larvas de *A. aegypti*.

Para verificar a possibilidade de influência da variação da temperatura na eficácia do isolado, foram realizados bioensaios em cinco temperaturas diferentes, que variavam de cinco em cinco graus na faixa entre $15 \pm 2^\circ\text{C}$ a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, valores estes também utilizados por Tun-Lin (2000) e Machado (2004). Para cada temperatura eram utilizados 3 repetições, 3 testemunhas, com 7 diluições: 0,05 ppm, 0,04 ppm, 0,033 ppm, 0,028 ppm, 0,025 ppm, 0,022 ppm e 0,02 ppm, sendo realizadas as leituras no final de 24 horas de incubação.

Para testar a influência da variação do pH utilizaram-se três repetições nas seguintes concentrações hidrogeniônica: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Para obtenção dos valores ácidos foi utilizado HCl e para os básicos NaOH. A testemunha ficou na mesma água destilada que foi usada para diluir os reagentes das outras concentrações.

A leitura de mortalidade foi realizada 24 horas após a inoculação do bioinseticida, quantificando-se as larvas vivas e mortas. As pupas foram descontadas da análise. Para os bioensaios iniciais (mata ou não mata) somente foi analisada a porcentagem de mortalidade. Já para os bioensaios para determinação de Cl_{50} e Cl_{95} , utilizou-se a análise de Probit para o bioensaio de resposta binária com o seguinte modelo matemático: $P_i = F(\alpha + \beta x_i)$, onde P_i probabilidade da resposta; $x_i = \log$ dose, α e β = parâmetros e F = Função de distribuição acumulada (HADDAD, 1998). Através do Probit determinou-se as concentrações letais (CL_{50} e CL_{95}) para comparar a eficácia dos isolados nas diversas situações empregadas. Para a análise dos resultados dos bioensaios com determinação das doses letais foi utilizado o teste comparativo de Tukey em nível de 5% de significância.

4.2.4 Reação de PCR

Os isolados de *B. thuringiensis* foram caracterizados morfológicamente para constatação de inclusões cristalinas. Para isso, após o cultivo dos isolados em placas de Petri, contendo meio de cultura ágar Nutriente (Peptona bacteriológica 5,0 g/L, extrato nutritivo 1,0 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L e ágar 15 g/L) e incubação a 30°C por 5 dias, foram preparadas lâminas contendo 20 µL da suspensão bacteriana de cada amostra, cobertas com lamínula e uma gota de óleo de imersão. A caracterização morfológica foi efetuada por meio da observação de células vegetativas, esporos e cristais de cada linhagem, visualizados em microscopia de contraste de fase.

Amostras de DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foram extraídas pelo método de Hansen & Hendriksen, (2001). Os isolados foram cultivados por 15 h em placas contendo meio Luria-Bertani (LB). Com o auxílio de um palito esterilizado, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para microtubos contendo 200 µL de TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA, pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em fervura por 10 min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos e utilizado como amostra de DNA para as reações de amplificação por PCR.

A presença dos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* foi analisada por meio da técnica de PCR (Tab. 4.2). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador TECHNE TC-512. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 20 µL, contendo: 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 2,0 µL de tampão 10 × (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 1,0 µM de cada iniciador, 2 µL do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada (qsp 20 µL).

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, em tampão SB 1X, usando marcador de 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen, Inglaterra).

Tabela 4.2 – Genes iniciadores e condições de amplificação utilizadas para pesquisa de genes *cry* e *cyt* em isolados de *B. thuringiensis*.

Nome Iniciador	Produto (pb)	Seqüência (5' - 3')	Ciclos	Desnaturação	Pareamento	Extensão	Fonte
<i>Cry4Aspe</i>	459	5' TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG	30	45 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[1]
<i>Cry4BspeD</i>	321	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[1]
<i>Cry4BspeR</i>	321	5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT			60 s, 50°C		[1]
<i>Cry10speD</i>	348	5' TCAATGCTCCATCCAATG	30	60 s, 94°C	60 s, 51°C	60 s, 72°C	[1]
<i>Cry10speR</i>	348	5'CITGTATAGGCCTTCCTCCG			60 s, 51°C		[1]
<i>Cry11gralD</i>	342 – 352	5' CGCTTACAGGATGGATAGG	30	45 s, 94°C	45 s, 50°C	60 s, 72°C	[1]
<i>Cry11gralR</i>	342 – 352	5'GCTGAAACGGCACGAATATAATA			45 s, 50°C		[1]
<i>Cyt1gralD</i>	477 – 480	5' CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT	30	60 s, 94°C	60 s, 52°C	60 s, 72°C	[1]
<i>Cyt1gralR</i>	477 – 480	5'TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT			60 s, 50°C		[1]
<i>Cyt2gralD</i>	355 – 356	5' ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC	30	15 s, 94°C	30 s, 50°C	30 s, 72°C	[1]
<i>Cyt2gralR</i>	355 - 356	5'TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC			30 s, 50°C		[1]

Todas as reações tiveram um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min e um passo final de extensão de 5 min a 72 °C. [1] Ibarra *et al.*, 2003

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Bioensaio Seletivo

Dos 27 isolados de *B. thuringiensis* submetidos aos testes de bioensaios seletivos, dez (37,04%) (Tab. 4.3) causaram 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* nas concentrações de 1 e 0,1 ppm. Estes 10 isolados foram submetidos a um segundo teste de bioensaios seletivos, onde houve a redução de concentração para 0,06 e 0,05 ppm. A partir deste segundo teste, selecionou-se cinco isolados que apresentaram mortalidade de 100% sobre as larvas de *A. aegypti* (Tab. 4.4), sendo estas submetidos aos testes de bioensaios quantitativos para cálculo da CL_{50} e CL_{95} .

Tabela 4.3 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti*, submetidas a diferentes concentrações de suspensões de isolados de *B. thuringiensis*, 24 horas após a aplicação da suspensão bacteriana. (Temperatura ambiente: 26 °C \pm 2°C; UR: 60 \pm 10%).

Isolados	Concentrações Mortalidade (%)		
	10 ppm	1 ppm	0,1 ppm
BR 06	100	88,8	80
BR 7	51,1	40	4,4
BR 12	57,7	46,6	0
BR 14	100	100	100
BR 18	62,2	51,1	35,5
BR 26	100	100	100
BR 27	0	0	0
BR 33	0	0	0
BR 34	0	0	0
BR 35	0	0	0
BR 36	100	100	100
BR 37	0	0	0
BR 38	0	0	0
BR 40	0	0	0
BR 41	0	0	0
BR 42	0	0	0
BR 44	0	0	0
BR 46	100	100	100
BR 53	100	100	100
BR 58	100	100	100
BR 64	100	100	100
BR 65	100	100	100
BR 78	91,1	82,2	53,3
BR 79	82,2	66,6	0
BR 83	100	100	100
BR 87	80	60	0
BR136	100	100	100

Tabela 4.4 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti*, submetidas a diferentes concentrações de suspensões de isolados de *B. thuringiensis*, após 24 horas da aplicação da suspensão bacteriana. (Temperatura ambiente: 26 °C ±2°C; UR: 62 ± 10%).

Isolados	Concentrações Mortalidade(%)		
	01ppm	0,06ppm	0,05ppm
BR 46	100	100	100
BR 64	100	100	100
BR 65	100	100	13.3
BR 58	100	100	0
BR 26	100	100	100
BR 36	100	100	100
BR 83	100	100	0
BR 53	100	100	0
BR 136	100	100	0
BR 14	100	100	100

Dos cinco isolados que apresentaram 100% de eficiência de controle larval, quatro originaram de amostras de solo e uma de grãos armazenados oriundos de diversas regiões do país (Tab. 4.6).

4.3.2 Bioensaio Quantitativo (CL₅₀ e CL₉₅)

A avaliação da toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis*, com o cálculo da CL₅₀ e CL₉₅, foi realizada para caracterização dos cinco isolados que apresentaram a maior toxicidade (Tab. 4.5). Para todos os bioensaios realizados, foi utilizada a linhagem *B. thuringiensis israelensis* (IPS 82), na forma liofilizada, como controle positivo. Sendo os resultados de 100% de mortalidade em todos os bioensaios realizados.

Os resultados para a CL₅₀ e CL₉₅ obtidos a partir dos experimentos de determinação de doses letais à temperatura ambiente, mostraram que os cinco isolados selecionados tiveram toxicidade superior ao IPS82, sendo para a CL₅₀ significativa pelo testes de Probit, significância não observado aos valores da CL₉₅ (Tab. 4.6).

Tabela 4.6 – Valores de CL₅₀ e CL₉₅ (em ppm) de isolados de *B. thuringiensis* contra lavas de quarto instar de *A. aegypti*, após 24 horas do início do bioensaio de dose. Temperatura: 25 ± 2 °C; UR: 60 ± 10%.

Isolados	CL50 (ppm) ¹	Intervalo de confiança (95%)	CL 95(ppm) ¹	Intervalo de confiança (95%)
BR 14	0,0197 ^a	0,0192 – 0,0204	0,0230 ^a	0,0221 – 0,0246
BR 26	0,0203 ^a	0,0197 – 0,0210	0,0241 ^a	0,0232 – 0,0255
BR 36	0,0205 ^a	0,0198 – 0,0213	0,0245 ^a	0,0232 – 0,0264
BR 46	0,0203 ^a	0,0197 – 0,0210	0,0242 ^a	0,0232 – 0,0255
BR 64	0,0203 ^a	0,0196 – 0,0209	0,0240 ^a	0,0230 – 0,0255
IPS 82	0,0213 ^b	0,0206 – 0,0222	0,0252 ^a	0,0239 – 0,0272

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Intervalo de Confiança, segundo o teste de Probit.

As testemunhas apresentaram mortalidade inferior a 6%.

De acordo com a análise dos resultados plotados na tabela 4.6, pode-se observar que os isolados apresentaram valores de mortalidades semelhantes, para a CL₉₅, mesmo quando comparadas com a linhagem padrão (IPS82).

4.3.3 Bioensaio (CL₅₀ e CL₉₅) em Diferentes Temperaturas

Os resultados da análise dos bioensaios dos experimentos conduzidos em diferentes temperaturas indicam que os isolados não tiveram diferença de letalidade. Na temperatura de 25°C ± 1°C, após 24 horas de exposição ao bioinseticida, ocorreu uma mortalidade intermediária, e para a temperatura de 15°C ± 1°C registrou-se a menor mortalidade para as faixas de temperatura estudadas. Todos os bioensaios foram analisados pelo Teste de Probit a 5% de significância e pelo teste de Tukey com o mesmo nível de significância (Tab. 4.7).

Tabela 4.7 – Valores de CL₅₀ e CL₉₅ (em ppm) de isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de quarto instar de *A. aegypti* em temperaturas de 15, 25 e 35°C ± 1°C; Fotoperíodo 12E: 12L.

Isolados	CL50			CL95		
	15°C	25°C	35°C	15°C	25°C	35°C
BR 14	0.0231 ^a	0.0203 ^a	0.0176 ^a	0.0294 ^a	0.0259 ^a	0,0229 ^a
BR 26	0.0229 ^a	0.0231 ^a	0.0175 ^a	0.0291 ^a	0.0258 ^a	0.0228 ^a
BR 36	0.0229 ^a	0.0204 ^a	0.0177 ^a	0.0291 ^a	0.0261 ^a	0.0277 ^a
BR 46	0.0231 ^a	0.0203 ^a	0.0176 ^a	0.0296 ^a	0.0259 ^a	0.0228 ^a
BR 64	0.0229 ^a	0.0234 ^a	0.0175 ^a	0.0290 ^a	0.0258 ^a	0.0228 ^a
IPS 82	0.0235 ^a	0.0215 ^a	0.0191 ^a	0.0286 ^a	0.0262 ^a	0.0244 ^a

Letras iguais na mesmas linha não diferem entre si pelo intervalo de confiança, segundo o teste de Tukey com 5% de significância.

As testemunhas apresentaram mortalidade inferior a 6%.

4.3.4 Bioensaio (CL₅₀ e CL₉₅) em Diferentes Concentrações Hidrogeniônicas

Nos bioensaios realizados com os diferentes isolados, em condições variáveis de pH da água, este parâmetro mostrou-se como um fator que pode alterar a eficácia das linhagens. Em valores baixos de pH ocorrem maior mortalidade das larvas quando comparados os resultados dos bioensaios conduzidos em valores neutro e alcalinos de pH neutro e alcalino (Tab. 4.8 e 4.9).

Tabela 4.8 – Valores de CL₅₀ (em ppm) de isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de quarto instar de *A. aegypti* em diferentes valores de pH. Temperatura: 25°C ± 1°C; Fotoperíodo 12E: 12L.

Isolados	pH								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BR 14	0.0175 ^a	0.0188 ^a	0.0201 ^a	0.0209 ^a	0.0220 ^a	0.0228 ^a	0.0237 ^b	0.0246 ^b	0.0248 ^b
BR 26	0.0179 ^a	0.0181 ^a	0.0202 ^a	0.0222 ^a	0.0228 ^a	0.0230 ^a	0.0233 ^a	0.0247 ^b	0.0249 ^b
BR 36	0.0176 ^a	0.0184 ^a	0.0201 ^a	0.0212 ^a	0.0219 ^a	0.0225 ^a	0.0241 ^b	0.0245 ^b	0.0247 ^b
BR 46	0.0174 ^a	0.0188 ^a	0.0201 ^a	0.0217 ^a	0.0224 ^a	0.0231 ^a	0.0234 ^a	0.0244 ^b	0.0247 ^b
BR 64	0.0177 ^a	0.0190 ^a	0.0202 ^a	0.0209 ^a	0.0221 ^a	0.0226 ^a	0.0236 ^b	0.0245 ^b	0.0251 ^b
IPS 82	0.0192 ^a	0.0206 ^a	0.0211 ^a	0.0237 ^b	0.0241 ^b	0.0244 ^b	0.0252 ^b	0.0264 ^c	0.0269 ^c

Letras iguais na mesmas linha não diferem entre si pelo intervalo de confiança, segundo o teste de Tukey com 5% de significância.

As testemunhas apresentaram mortalidade inferior a 6%.

Tabela 4.9 – CL₉₅ de isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de quarto instar de *A. aegypti* em diferentes valores de pH. Temperatura: 25°C ± 1°C; Fotoperíodo 12E: 12L.

Isolados	pH								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BR 14	0,0226 ^a	0,0229 ^a	0,0236 ^a	0,0244 ^a	0,0259 ^a	0,0263 ^b	0,0271 ^b	0,0280 ^b	0,0294 ^b
BR 26	0,0224 ^a	0,0231 ^a	0,0244 ^a	0,0251 ^a	0,0258 ^a	0,0267 ^b	0,0272 ^b	0,0284 ^b	0,0291 ^b
BR 36	0,0239 ^a	0,0255 ^a	0,0260 ^a	0,0269 ^b	0,0274 ^b	0,0278 ^b	0,0282 ^b	0,0287 ^b	0,0292 ^b
BR 46	0,0222 ^a	0,0230 ^a	0,0246 ^a	0,0252 ^a	0,0259 ^a	0,0265 ^b	0,0277 ^b	0,0283 ^b	0,0296 ^c
BR 64	0,0223 ^a	0,0229 ^a	0,0240 ^a	0,0251 ^b	0,0258 ^b	0,0263 ^b	0,0271 ^b	0,0280 ^c	0,0290 ^c
IPS 82	0,0241 ^a	0,0246 ^a	0,0252 ^a	0,0260 ^a	0,0262 ^b	0,0269 ^b	0,0273 ^b	0,0281 ^b	0,0286 ^b

Letras iguais na mesmas linha não diferem entre si pelo intervalo de confiança, segundo o teste de Tukey com 5% de significância.

As testemunhas apresentaram mortalidade inferior a 6%.

4.3.5 Caracterização dos Isolados de *Bacillus thuringiensis*

Através da microscopia de contraste de fase foi confirmado que os cinco isolados utilizados neste trabalho, provenientes de diversas regiões brasileiras, pertencem à espécie *B. thuringiensis*, devido às características morfológicas visualizadas, inerentes a essa espécie, como célula vegetativa, esporos e cristais.

A amplificação dos fragmentos de tamanho esperado (Tabela 4.2) foi obtida por PCR utilizando-se dos pares de oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10A*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cry11Bb*, *cyt1Aa*, *cyt1Ba*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa*, *cyt2Bb* e *cyt2Ca* (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3), os quais são específicos contra insetos da ordem Diptera. As análises permitiram verificar que, dos 5 isolados submetidos a PCR, todos apresentaram amplificação dos genes estudados, sendo sempre analisados juntamente com a linhagem padrão (IPS82) e *Bacillus thuringiensis israelensis*.

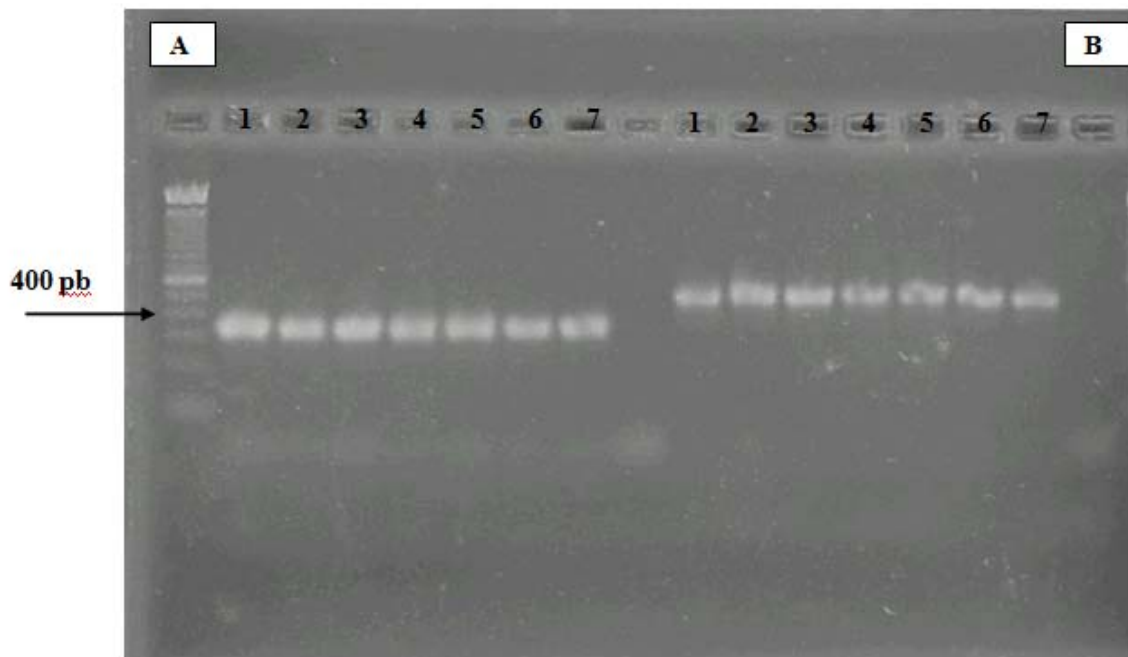


Figura 4.1 – Eletroforese da determinação dos genes: *cry4A* (A) e *cry4B* (B), para amostras dos isolados Br 26 (1), Br 14 (2), Br 36 (3), Br 46 (4), Br 64 (5), Bti (6) e IPS82 (7), do banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina; marcador molecular “1Kb DNA ladder”

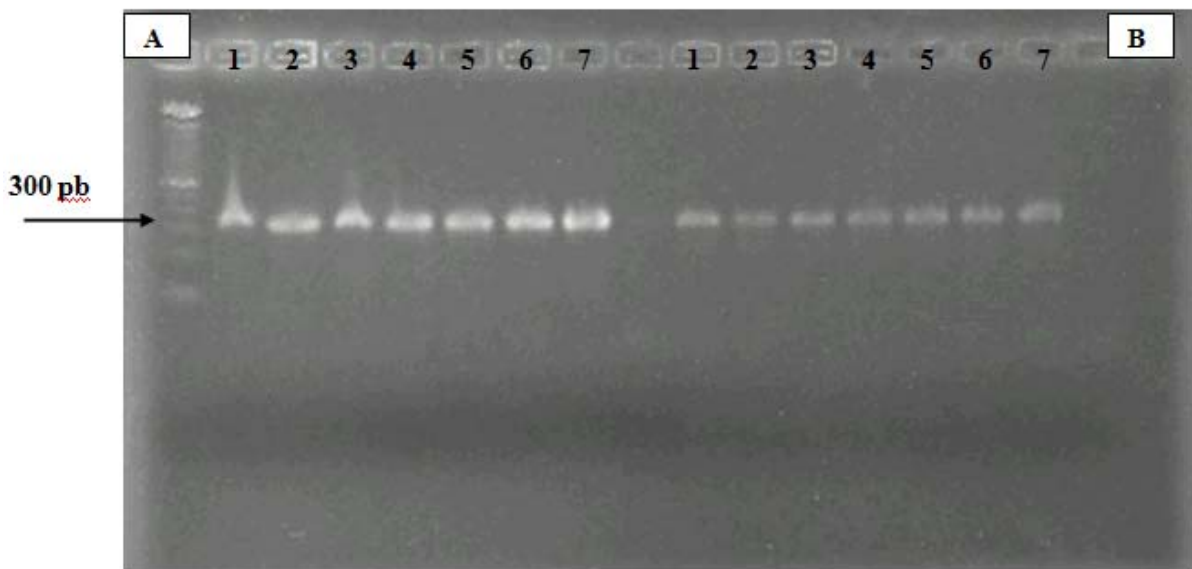


Figura 4.2 – Eletroforese da determinação dos genes: *cry10* (A) e *cry11* (B), para amostras dos isolados Br 14 (1), Br 26 (2), Br 36 (3), Br 64 (4), Br 46 (5), Bti (6) e IPS82 (7), do banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina; marcador molecular “1Kb DNA ladder”.

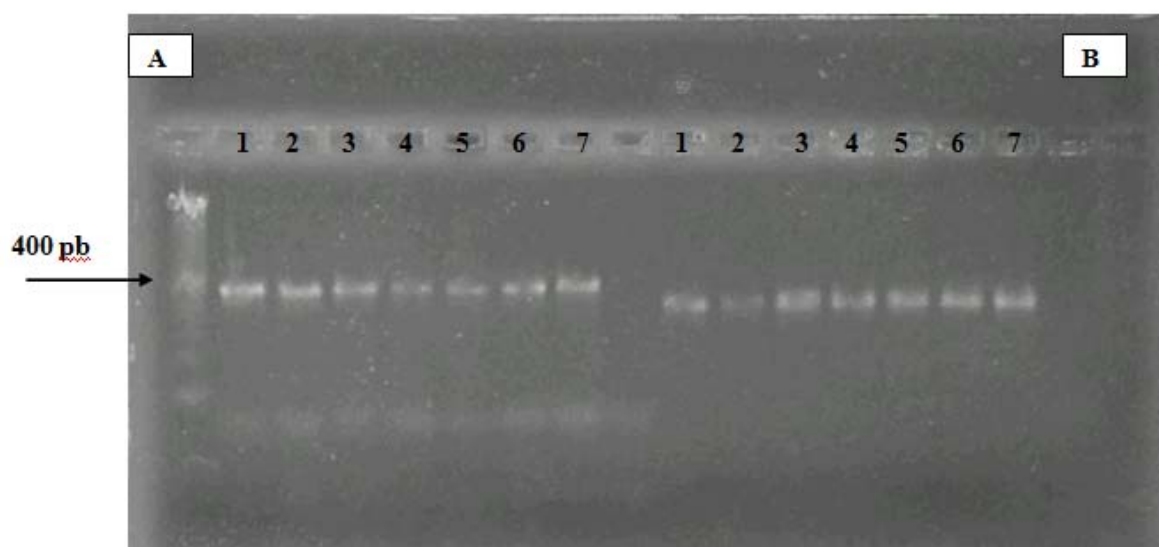


Figura 4.3 – Eletroforese da determinação dos genes: *cyt1* (A) e *cyt2* (B), para amostras dos isolados Br 14 (1), Br 26 (2), Br 36 (3), Br 64 (4), Br 46 (5), Bti (6) e IPS82 (7), do banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina; marcador molecular “1Kb DNA ladder”.

4.4 DISCUSSÃO

A ação letal determinada para os cinco isolados estudados, caracteriza-os como promissores para serem utilizadas como princípio ativo de bioinseticidas a serem utilizados no controle de *A. aegypti*, já que os resultados obtidos em bioensaios são semelhantes aos encontrados para a linhagem IPS 82, base para a realização e bioensaios internacionais.

A grande extensão do Brasil, o qual apresenta diferentes regiões com diferenças climáticas, assim como a grande diversidade de insetos, permite o isolamento de novas linhagens de bactérias entomopatogênicas. Os isolados de *B. thuringiensis* analisados neste trabalho podem representar esse exemplo de diversidade. Poucos estudos têm relatado caracterização detalhada de coleções de *B. thuringiensis* em termos de conteúdo de genes *cry* e *cyt* letais para espécies da ordem Diptera. Ibarra *et al.* (2003), por meio de PCR, utilizaram 27 iniciadores para detectar 17 diferentes genes *cry* e *cyt* em uma coleção de 6.531 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de países da América Latina, encontrando diferentes combinações entre os genes diptero-específicos *cry4*, *cry10*, *cry11* e *cyt*. A

combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* foi encontrada em três isolados, onde a presença do *cry10* foi ausente e, a combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt2* em apenas um isolado, as quais são semelhantes à aquelas encontradas em *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os autores demonstraram a alta eficiência desses isolados a larvas de *A. aegypti*. Diferentemente dos resultados obtidos por Ibarra *et al.* (2003), todos os isolados caracterizados geneticamente apresentaram os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* e *cyt2*. Este complexo gênico pode explicar a elevada eficiência apresentada pelos isolados testados.

Este trabalho mostrou uma abundância de isolados díptero-específicos não foi, onde de 27 isolados testados inicialmente, cinco (18,52%) apresentaram mortalidade de 100% sobre larvas de *A. aegypti*. Geralmente a frequência de isolados díptero-específicos em uma coleção de *B. thuringiensis* é baixa quando comparada à de isolados lepidóptero-específicos. A partir de 38 isolados de *B. thuringiensis*, Cavaleiro *et al.* (2005) identificaram 14 isolados patogênicos, sendo 13 a insetos da ordem Lepidoptera e um a insetos da ordem Diptera (*A. aegypti*), com 100% de mortalidade, o qual, através da técnica de eletroforese de proteínas-cristal, apresentou perfil protéico semelhante ao *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo identificados as proteínas Cry4A, Cry4B, Cry10, Cry11, Cyt1 e Cyt2, que são conhecidos por desempenharem um papel fundamental no controle de mosquitos (BRAVO *et al.*, 1998; IBARRA *et al.*, 2003).

Ferrandis *et al.* (1999), na Espanha, encontraram, em uma coleção de 223 isolados de *B. thuringiensis*, 121 (54,3%) isolados que continham o gene *cry1*. Duas coleções de *B. thuringiensis*, provenientes de ambientes terrestres e aquáticos foram caracterizadas quanto ao conteúdo de genes *cry* por Martinez & Caballero (2002). A maior frequência encontrada entre os isolados também foi para os genes lepidóptero-específicos, não encontrando os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* e *cry11A* nos isolados analisados.

Tendo em vista a possibilidade de seleção de populações de insetos resistentes ao produto biológico que utilize determinada linhagem de *B. thuringiensis*, uma das formas de manejá-la é através da utilização de novos isolados desta espécie que apresentem perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry* e *cyt*. A presença destes diferentes genes não significa que eles estejam sendo expressos; no entanto, dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados na formulação de novos bioinseticidas comerciais efetivos para dípteros. Pois, conforme

verificado no trabalho, as novas estirpes apresentaram mortalidades superiores ao padrão IPS82, sendo estatisticamente distintas ao nível de 5% de significância.

Os isolados estudados apresentaram o perfil protéico da linhagem padrão IPS82, este fato justifica a elevada mortalidade verificada nos bioensaios. Schenepf *et al.* (1998), afirmaram que embora possa haver uma grande variabilidade de genes *cry* que codificam diferentes toxinas específicas a mosquitos existentes na natureza, uma das combinações mais efetivas de proteínas é aquela presente na linhagem padrão IPS82, a qual apresenta os genes *cry4*, *cry10* e *cry11* e toxinas Cyt.

Esta combinação protéica permite uma ação integrada, potencializando o poder inseticida, como pode ser verificado no trabalho de Federici *et al.* (1990), onde constataram-se que a toxina Cry11Aa apresenta maior toxicidade em *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* Liston, 1901 e *Culex pipiens* Linnaeus, 1758, enquanto a proteína Cyt1Aa é pouco tóxica, mas tem efeito sinérgico com as proteínas Cry (GOULD, 1998,; PROMDONKOY & ELLAR, 2000; FERNANDEZ *et al.*, 2005). As proteínas Cry4A e Cry4B também têm sido reportadas agindo sinergisticamente em larvas de mosquito (BRAVO *et al.*, 2007).

Todos os isolados (BR14, BR26, BR36, BR46 e BR64) submetidos a análise de PCR, apresentaram mortalidade superior ao IPS82 (Tab.6), sendo todos com o mesmo perfil protéico do padrão. Ibarra *et al.* (2003) identificaram novos isolados de *B. thuringiensis* com atividade tóxica a *A. aegypti*. Dentre eles, quatro foram superiores ao *B. thuringiensis* padrão, apresentando perfil protéico similar à ele e um, com atividade tóxica similar, apresentou quatro proteínas diferentes (Cry11, Cyt1, Cyt2 e Cry30). A associação entre as toxinas Cry e Cyt1A pode ser a base das interações sinérgicas para larvas de dípteros (TABASHNIK, 1992). De fato, o trabalho de Perez *et al.* (2005) mostrou que as toxinas Cry11Aa e Cyt1A têm a capacidade de se ligar através de epítomos existentes em ambas as moléculas e, ensaios de interação mostraram que a ligação de Cry11Aa à BBMF (Frações ricas em microvilosidades intestinais em *A. aegypti*) foi otimizada pela presença da Cyt1A. Já, o trabalho de Beltrão & Silva-Filha (2007), com ensaios de competição, mostrou que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, unem-se especificamente à BBMF de *A. aegypti*, sendo a afinidade para os sítios de união alta, sugerindo que o aumento na afinidade de união poderia ter sido dada por meio da interação sinérgica com a toxina Cyt1Aa. Este dado reforça a idéia da necessidade de associação entre as

toxinas Cry e a Cyt para a interação com o epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti*, combinação esta encontrada nos isolados caracterizados.

Pode-se considerar que, a comparação da toxicidade com os diferentes genes da família *cry*, mostra claramente a elevada atividade inseticida, isto foi observado no presente trabalho, pois todas as linhagens testadas apresentaram genes desta família. De fato, o grande número de proteínas Cry compondo os cristais de linhagens de *B. thuringiensis* favorece o não aparecimento de populações de insetos resistentes aos produtos a base desta bactéria. Neste trabalho, todas as linhagens analisadas apresentaram quatro proteínas Cry diferentes, além de duas proteínas Cyt, o que demonstra o grande potencial de uso destas linhagens no controle de populações de *Ae. Aegypti* e outros mosquitos.

Delécluse *et al.* (1995) testaram a atividade larvicida com inclusões purificadas de um isolado de *B. thuringiensis* var. *jegathesan* e de uma linhagem recombinante produzindo unicamente a proteína Cry11A, contra *A. aegypti*, *Anopheles stephensis* Liston, 1901 e *C. pipiens*. O polipeptídeo Cry11B do isolado foi tóxico contra as três espécies testadas, com alta atividade contra *C. pipiens*, sendo mais tóxico do que a linhagem padrão contra *A. aegypti* e igualmente tóxico a *C. pipiens* e *A. stenphensi*. Embora *cry11B* tenha similaridade com *cry11A*, ele apresentou-se mais tóxico a *A. aegypti*. Esta informação reforça a compreensão dos resultados obtidos no presente trabalho, pois todos os isolados testados apresentaram os genes *cry11B* e *cry11A*, genes estes, segundo o autor acima citado, responsáveis por apresentarem alta toxicidade.

Esta elevada atividade tóxica também pode ser explicada baseada nos genes *cry4Ba* e *cyt2a*, pois segundo Promdonkoy *et al.* (2005) a co-expressão das toxinas Cry4Ba e Cyt2A, produzidas em *E. coli* incrementou a toxicidade para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, demonstrando, com isto, a alta atividade sinérgica entre as toxinas combinadas, sendo estas toxinas presentes nos isolados testados.

Em relação aos resultados obtidos nos bioensaios com diferentes temperaturas, não observou-se diferença de mortalidade larval em temperaturas mais altas. Tanto Tun-Lin *et al.* (2000) como Calado & Silva (2002) apontam que para *A. aegypti* e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), a faixa entre 20°C e 30 °C é a ideal para o crescimento das larvas e, que abaixo desta temperatura torna-se prejudicial, pois diminui o seu metabolismo. Diminuindo a atividade alimentar, reduz

a possibilidade da larva ingerir o cristal protéico do *B. thuringiensis israelensis*. Com os dados obtidos é possível inferir que para o controle de *A. aegypti*, utilizando-se estes isolados, a faixa entre 20°C e 35°C de temperatura ambiental seria ideal para a sua aplicação. Temperaturas acima e abaixo destes limites são apontadas por Tun-Lin *et al.* (2000) como sendo prejudiciais no desenvolvimento ou são letais para as larvas.

Pelo melhor desempenho dos isolados bacterianos quando em pH abaixo de 7,0 pode-se inferir que as larvas sejam mais fago ativas, ou tornam-se mais sensíveis aos isolados de *B. thuringiensis* em pH ácido. Bem-Dov *et al.* (2003) apontam que provavelmente o pH alcalino pode ativar o cristal no meio, antes de ingerido pelas larvas, e também as partículas nutritivas em pH alcalino, podem ficar por mais tempo no intestino das larvas, diminuindo assim a toxicidade do isolado.

4.5 CONCLUSÃO

Investimento na prospecção de isolamento de novas linhagens de patógenos que possam ser utilizados, diretamente ou substâncias por eles sintetizadas, na produção de inseticidas biológicos, corresponde ao passo inicial para o desenvolvimento de novos métodos e ou técnicas na formulação de produtos comerciais. Pode também, estes Bancos de isolados bacterianos servirem de fonte de genes para transferência em diversos microrganismos aquáticos, que possam vir a ser empregado no controle biológico de insetos.

5 REFERÊNCIAS

- ARANTES, O.M.N.; L.A. VILAS-BOAS & G.F.L.T.; G.F.L.T. VILAS-BOAS. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: SERAFIN, L.A.; N.M. BARROS & J.L. AZEVEDO. (Org.). **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria**. 2. Caxias do Sul: EDUSC. 2002. : 269 – 293.
- ARAÚJO, A.P.; MELO-SANTOS, M.A.V.; CARLOS, S.O.; RIOS, E.M.M.M.; REGIS, L. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**. Washington, v.41, n.3, p.339-347, jun. 2007.
- BELTRÃO, H.B.M. & SILVA-FILHA, M.H.N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.266, n.2, p.163-169, jan. 2007.
- BEM-DOV, E.; SAXENA, D.; WANG, Q.; MANASHERD, R.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Entomology**, v.127, p.146-152, mai. 2003.
- BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.70, n.1, p.59-68, mar. 1997.
- BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Cuernavaca, México, v.49, n.2, p.423-435, abr. 2007.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p.4965-4972, dez. 1998.
- CALADO, D.C.; SILVA, M.A.N. Avaliação da influencia da temperatura sobre o desenvolvimento de *Aedes albopictus*. **Revista de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.36, n.2, p.173-179, abr. 2002.
- CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p. 3057-3061, nov. 1991.
- CAVALEIRO, H.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; MEDEIROS, P. T.; GOMES, A. A. M. M.; MONNERAT, R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v.87, n.3, p.1-22, dez. 2005.

CHAUFAUX, J.; M. MARCHAL, N. GILOIS, I.; JEHANNO & C. BUISSON. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.43, n.4, p.337 – 343, out. 1997.

CRICKMORE, N. *et al.* 2010. "**Bacillus thuringiensis** toxin nomenclature" Disponível: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 24 fev. 2010.

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX. C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**: Netherlands Klumer Academia Publishers. 1998, p.23-40.

DRAFT. Determination of the Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. sphaericus* products, p.29-33. In: WHO/CDS/CPC?WHOPES/99.2. **Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use**. 1999, 33 p.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M.L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquicidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.1, p. 4230-4235, set. 1995.

FEDERICI, B.A.; LUTHY, P.; IBARRA, J.E. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Structure protein composition and toxicity. In: BARJAC, H. D. & SUTHERLAND, D. D. J. (Eds.): **Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies**: Biochemistry. Genetics & Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. 1.ed. Rutgers Univ. Press. New Brunswick, N.J., 1990, p.16-44.

FERNÁNDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M.H.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop a-8 of domain II. **FEBS Letters**, Europa, v.579, n.17, p.3508-14, jul. 2005.

FERRANDIS, M. D.; JUÁREZ-PÉREZ, V. M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v.22, n.2, p.179-185, nov. 1999.

GONZÁLES, J.M.J.; B.S. BROWN & B.C. CARLTON. Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.79, n.22, p.6951-6955. nov. 1982

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.3, p.701-26, fev. 1998.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (coord) **Controle microbiano de insetos**. 1 ed. Piracicaba: Manole, 1998. p.383-446.

HADDAD, M.L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba, FEALQ, p. 999-1013, 1998.

HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington DC, v.67, n.1, p.185-189, jan. 2001.

IBARRA, J.E.; DEL RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NOIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; DE OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.9, p.5269-5274, set. 2003.

JARA, S.; MADUELI, P.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strain in the maize and bean phytoplane and their respective soils in Colombia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.101, p.117-124, jun. 2006.

JOUZANI, G.S.; ABAD, A.P.; SEIFINEJAD, A.; MARZBAN, R.; KARIMAN, K.; MALEKI, B. Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Berlin, 35, n.2, p.83 – 94, fev. 2008.

LACEY, L.A. Laboratory bioassay of bacteria against aquatic insects with emphasis on larvae of mosquitoes and black flies. In: LACEY, L.A. **Manual of Techniques in Insect Pathology**, London, Academic Press, p. 79-90, 1997.

LECADET, M. M.; BLONDEL, M. O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. berliner 1715, using bacteriophage CP54 Ber. **Brazilian Journal Genetic Microbiology**, São Paulo, v.121, p.203-212, mar. 1980.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (ed) ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice.*** Chichester: John Wiley & sons, 1993. p.37-70.

OTIENO-AYAYO; ZARITSKY, A.; WIRTH, M.C.; MANASHEROB, R.; KHASDAN, V.; CAHAN, R. & BEN-DOV, E. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.10, n.9, p. 2191-2199, set. 2008.

MACHADO, E.J.P. **Influencia de fatores bióticos e abióticos na patogenicidade do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no controle de larvas de *Aedes aegypti*.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, (Monografia curso de ciências Biológicas), 2004, 26p.

MARTÍNEZ, C. & CABALLERO, P. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.4, p.745-752, jul. 2002.

MARTÍNEZ, C.; PORCAR, M.; LÓPEZ, A.; EXSUDERO, I.R.; CABALLERO, P. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Holanda, v.11, n.1, p.71-77, jan. 2004.

MEADOWS, M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticida: **theory and practice**. Chichester: John Wiley, 1993, p.93-220.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA, 1998. 264p.

MELO-SANTOS, M.A.V. **Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, (Dissertação, Mestrado em Biologia Animal), 2001, 74 p.

MONNERAT, R.S. & BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 3.ed., 2000. p. 163-200.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L.E.; SUN, J.; FOLCH, J.L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v.102, n.51, p.18303-18308, dez. 2005.

PINTO, L.M.N. & FIUZA, L.M. PCR and bioassays screening of *Bacillus thuringiensis* isolates from rice fields of Rio Grande Do Sul specific to lepidopterans and coleopterans **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n.4, p.305-310, dez. 2003.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *B. thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.

PROMDONKOY, B. & ELLAR, D.J. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**, London, v.350, n.1, p.275-282, ago. 2000.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN-RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.3, p. 775-806, set. 1998.

SMITH, R. A.; COUCHE, G. A. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.1, p.311-331, jan. 1991.

TABASHNIK, B.E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.10, p.3342-3346, out. 1992.

TUN-LIN, W.; BURKOT, T.R.; KAY, B.H. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of, the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. **Australia Medical and Veterinary Entomology**. Australia, v.14, p. 31-37, mar. 2000.

VILAS-BÔAS, G.T.; LEMOS, M.V.F. Diversity of genes *cry* and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.50, n.8, p.605-613, jul. 2004.

WIRTH, M.C.; FERRARI, J. A.; GEORGHIOU, G. P. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in population of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from Mediterranean islands of Cyprus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.4, p.920-928, set. 2004.

WIRTH, M.C.; JIANNINO, J.A.; FREDERICI, B.A.; WALTON, W.E. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.88, n.2, p. 154-162, fev. 2005.

YOUSTEN, A.A. *Bacillus sphaericus* microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, New York, v.3, p.315-343, nov. 1984.