

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA À BASE DE *Bacillus thuringiensis israelensis* CONTRA O *Aedes aegypti*

MÔNICA HOEVELER

Porto Alegre, Dezembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

MÔNICA HOEVELER

PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDA À BASE DE *Bacillus thuringiensis israelensis* CONTRA O *Aedes aegypti*

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PROF. DR. JOSÉ CARLOS GERMANI
Orientador

Porto Alegre, Dezembro de 2016.

Dedicado aos meus pais Ana e Flávio, pela paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor José Carlos Germani pela paciência e dedicação como meu orientador e amigo.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é um problema cada vez mais grave de saúde pública no Brasil, como vetor da Dengue, Chikungunya e Zika. Nesta monografia buscou-se propor a produção de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis israelensis* por via fermentativa submersa em escala industrial em reator de 5000L, com o objetivo de combater o mosquito. Os objetivos foram realizar uma produção adequada às condições brasileiras, com um produto eficaz, economicamente viável, propondo formulação que considere a estabilidade e retenção de atividade, e propor um controle de qualidade. A matéria-prima utilizada foi soro de queijo hidrolisado, recuperado por centrifugação e secagem por *spray-dryer*. A formulação proposta foi de briquete flutuante desintegrante efervescente. O método de avaliação da atividade larvicida e o controle de qualidade foram propostos conforme a literatura. Os objetivos estabelecidos foram alcançados, obtendo-se um produto com alta especificidade contra o inseto-alvo, baixo dano ao meio ambiente e organismos não-alvo, de fácil produção e aplicação e economicamente viável.

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (figura 1) é o vetor principal de transmissão dos vírus da Dengue, Chikungunya, Febre amarela e Zika aos humanos. Mais da metade da população mundial vive em áreas com a presença deste mosquito. (WHO, 2016a) Segundo a World Health Organization (2016b), os mosquitos geralmente se tornam carregadores do vírus ao se alimentarem do sangue de pessoas infectadas. Após o período de incubação do vírus, a fêmea do mosquito ao se alimentar transmite o vírus a indivíduos suscetíveis. Os estágios imaturos dos mosquitos se encontram em habitats com água, na maioria dos casos em recipientes artificiais (WHO, 2016b). Os ovos podem sobreviver por longos períodos sem água, até por mais de um ano. Na presença de água, eclodem, permanecendo em estágio larval até a temperatura estar elevada o suficiente para seu desenvolvimento (WHO, 2016a).



Figura 1: Mosquito *Aedes aegypti*
Fonte: <http://www.travelhealth.gov.hk>

Evidências sugerem que a espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é originária da África (CHRISTOPHERS, 1960). Segundo dados da PAHO (2013) a Dengue está presente nos Estados Unidos da América, México e todos os países da América Central e da América do Sul, exceto o Chile. No Brasil o *Aedes aegypti* está presente nos 26 estados e no Distrito Federal (PORTAL DA SAÚDE, 2014) e o período de pico de transmissão ocorre em abril. Registre-se que a infestação se reinstalou nos 18 países que previamente eliminaram o vetor (TAUIL, 2002).

No Brasil, em 2015 foram observados 1.649.008 casos prováveis de dengue comparados a 2014 com 589.107 casos prováveis de dengue. No Rio Grande do Sul foram registrados 1.792 casos prováveis em 2015 e até o dia 2 de abril de 2016 foram registrados

802.429 casos de dengue no Brasil, com 2.436 no Rio Grande do Sul (PORTAL DA SAÚDE, 2016). O número de casos no Rio Grande do Sul em apenas três meses, já superou o do ano de 2015 em 35,9%. Estes dados mostram a fundamental importância que deve ser dada no combate ao mosquito devido à epidemia estar tomando grandes proporções.

A espécie *Aedes albopictus* também pode ser encontrada em vasilhames, mas tem seu hábitat natural da floresta, e pode vir a se tornar importante na transmissão das doenças virais que o *Aedes aegypti* transmite (BRAGA; VALLE, 2007).

O vírus da Dengue é um Flavivirus, possuindo quatro serotipos diferentes: DENV1, DENV2, DENV3, DENV4. Indivíduos infectados com um serotipo podem ser infectados pelo vírus de outro serotipo, o que pode levar à doença novamente (HALSTEAD, 1983).

A Dengue pode ser assintomática, leve, ou pode ser grave, levando à morte. Seus sintomas iniciais incluem febre alta (39 a 40°C) de início abrupto e que dura de 2 a 7 dias, acompanhada de dores no corpo e articulações, prostração, fraqueza, dor atrás dos olhos, erupção e coceira na pele. Não existe tratamento específico, e sim para o alívio dos sintomas (BRASIL, 2016). A maioria dos pacientes se recupera bem, mas uma pequena parcela evolui para o quadro grave da doença, chamado comumente de Dengue hemorrágica, a qual se caracteriza por vazamento de plasma com ou sem hemorragia, e o tratamento é realizado por reidratação intravenosa. A reidratação reduz os casos de morte a menos de 1% dos casos severos (WHO, 2009). Mesmo assim, ocorreram 140 óbitos por Dengue até a data de 2 de abril deste ano, mostrando a importância do controle da Dengue e do vetor *Aedes aegypti* (PORTAL DA SAÚDE, 2016a).

A primeira vacina da dengue consiste de um vírus febre-amarela-17-D-dengue recombinante, vivo, atenuado, tetravalente (CYD-TDV; Dengvaxia®, Sanofi Pasteur). Foi recentemente licenciada para uso em indivíduos de 9 a 45 anos no México, **Brasil**, Filipinas, El Salvador e Paraguai. (PITISUTTITHUM; BOUCKENOOGHE, 2016)

A vacina contra a Dengue, com registro concedido pela ANVISA, deve ser administrada por via subcutânea em três aplicações, com intervalos de seis meses. Começa a fazer efeito a partir da primeira dose, com eficácia demonstrada após a finalização de todas as doses. Pessoas que já contraíram a doença podem tomar a vacina, mas ela é contraindicada durante a gravidez (PORTAL BRASIL, 2016). A vacina brasileira desenvolvida pelo

Instituto Butantan em parceria com o National Institutes of Health (EUA), está na última fase de testes. Esta vacina é tetravalente, de dose única, de vírus vivo atenuado e o Instituto acredita ter a vacina disponível para registro até 2018 (SÃO PAULO, 2016).

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alphavirus pertencente à família Togaviridae (Porterfield, 1980 *apud* FRANGEUL et al., 2006). Os principais sintomas da Chikungunya são febre de início rápido e dores articulares intensas principalmente em mãos e pés, incluindo dedos, tornozelos e pulsos. Pode ocorrer também dor de cabeça, muscular e eritemas e é possível ter a doença apenas uma vez na vida (BRASIL, 2016).

O vírus Zika (ZIKV) é um Flavivirus da família Flaviviridae. A doença causada pelo vírus Zika diferencia-se das doenças anteriores pela febre baixa e dores leves nas articulações, ocorrendo também manchas avermelhadas na pele, coceira e vermelhidão nos olhos. Em geral, tem evolução benigna com resolução após 3 a 7 dias, e 80% das pessoas infectadas não apresentam manifestações clínicas. Entretanto, a gravidade do vírus Zika se revela quando o Ministério da Saúde confirmou a relação do mesmo com casos de microcefalia. Microcefalia é uma má formação congênita na qual ocorre o nascimento dos bebês com o perímetro cefálico inferior a 32 cm, que pode ter origem por diversos fatores, inclusive agentes biológicos. O Instituto Evandro Chagas encaminhou o resultado de exames realizados em um bebê nascido com microcefalia e outras malformações, e nas amostras de sangue e tecidos foi encontrado o vírus Zika. A forma principal de transmissão ocorre pela picada do mosquito *Aedes aegypti* e também de mãe para filho (BRASIL, 2016; CDC, 2016). No entanto, existem evidências de que a transmissão pode ocorrer através do contato sexual, conforme os relatos de pessoas que viajaram aos locais de circulação do vírus e que transmitiram o vírus ao retornarem ao seu país de origem (HILLS et al., 2016; FOY et al., 2011). O vírus Zika pode ser detectado no soro, na saliva (MUSSO et al., 2015) e na urina (GOURINAT et al., 2015); foi também detectado no leite materno (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015) e no semen (ATKINSON et al., 2016), havendo já o registro de um caso de transmissão por transfusão de sangue (PAULO, 2015).

No Brasil, com o recente surgimento do vírus Zika e dos casos de microcefalia por ele causados, torna-se cada vez mais importante o combate ao mosquito vetor transmissor da Dengue e da Chikungunya. No entanto, o combate encontra atualmente um novo obstáculo crítico devido à resistência crescente dos insetos aos larvicidas e adulticidas de uso habitual no controle biológico (TAUIL, 2002). Além da resistência aos inseticidas organoclorados já

relatada, tem surgido resistência das larvas e dos mosquitos aos organofosforados e dos mosquitos adultos aos piretróides. A resistência aos agentes químicos de controle deve ser monitorada permanentemente, bem como intensificada a busca de novos produtos inseticidas eficazes e seguros ao meio ambiente (TAUIL, 2002). Com o aumento da resistência, aumentam o risco ambiental e o custo do controle, devido à necessidade de um número maior de aplicações para garantir um controle satisfatório. Estes aspectos negativos podem ser evitados utilizando-se produtos com diferentes modos de ação, o que diminui a chance do aparecimento de resistência (POLANCZYK; GARCIA MDE; ALVES, 2003).

Rose (2001) sugere um controle integrado sustentável dos vetores, incluindo a vigilância, a redução da fonte (ou manejo ambiental), o controle biológico, o controle químico com uso de inseticidas e repelentes, armadilhas e manejo de resistência a inseticidas. A redução da fonte consiste em eliminar ou tornar inadequado o ambiente onde a larva se desenvolve, e educar a população é o seu ponto crítico.

Segundo Braga e Valle (2007), o controle biológico faz uso de predadores dos mosquitos, desde invertebrados aquáticos como *Toxorhynchites* ou copépodos, a peixes (*Gambusia sp.* e outros) que comem as formas imaturas dos mosquitos. Entre essas medidas se encontram também os patógenos como o fungo *Lagenedium giganteum* e os parasitas nematódeos (ROSE, 2001). As bactérias *Bacillus thuringiensis israelensis* (MULLA et al., 1982) e *Bacillus sphaericus* (GOLDBERG; MARGALIT, 1977) têm um excelente potencial para diminuir a infestação de mosquitos. Os produtos formulados à base de bactérias entomopatogênicas tem se destacado, pois, embora apresentem um preço um pouco maior do que o dos produtos químicos de uso tradicional, se tornam competitivos quando consideradas todas as suas vantagens em relação ao meio ambiente e animais (VILLARINHOS et al, 1998 *apud* POLANCZYK, 2003).

Segundo a Funasa (2001), o controle químico por ser mais agressivo, deve ser a última alternativa de controle utilizado, devendo-se dar preferência a ações mais eficazes. No Brasil, os inseticidas químicos mais usados no controle de vetores são os organofosforados, carbamatos e piretróides, e seus mecanismos de ação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Mecanismos de Ação dos Inseticidas Químicos

Grupo de Inseticida	Mecanismo
Organoclorados	Atuam em canais de sódio, destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio e impedindo a transmissão do impulso nervoso.
Organofosforados	Inativação irreversível da Acetilcolinesterase por fosforilação.
Carbamatos	Inativação reversível da Acetilcolinesterase por carbamilação.
Piretróides	Atuam nos cais de sódio, mantendo-os abertos.

Fonte: BRAGA e VALLE, 2007.

Os organoclorados deixaram de ser utilizados devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecidos biológicos, sendo proibidos em vários países (TURUSOV et al., 2002). Entretanto, ainda são preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o controle do vetor da malária (WHO, 2005) e da leishmaniose (WHO, 2010). Porém, a tendência é que o seu uso continue em países em desenvolvimento apenas até que alternativas efetivas, seguras e baratas sejam apresentadas (TURUSOV et al., 2002).

O Diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus metabólitos afetam o sistema reprodutor por agirem no sistema endócrino. Em estudos com animais, a exposição ao DDT causou tumores no fígado, pulmão e adrenal, no entanto, até o momento não existem evidências claras de que a substância causa câncer em humanos (HARADA et al., 2016).

Os organofosforados incluem todos os inseticidas que contêm fósforo, sendo amplamente utilizados em saúde pública por suas vantagens sobre os organoclorados. São biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos, mas, sendo instáveis quimicamente requerem reaplicações constantes (BRAGA; VALLE, 2007). São tóxicos para os mamíferos, e entre seus representantes existem substâncias extremamente tóxicas, como o Parathion, e outras de baixíssima toxicidade, como o Temephós (FUNASA, 2001). Segundo Chavasse e Yap (1997), o Temephós é o único larvicida deste grupo recomendado pela OMS para uso em água potável.

Os Carbamatos, pela inibição da acetilcolinesterase ser reversível, são considerados mais seguros que alguns fosforados, porém, seu alto custo restringe o uso em controle de vetores, sendo mais utilizado no controle da transmissão da peste bubônica (FUNASA, 2001).

Os Piretróides, segundo Paltrich (1996 *apud* BRAGA e VALLE, 2007), são biodegradáveis, não se acumulam e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos, mas podem levar a reações de hipersensibilização e causar irritação das mucosas

nesses animais. Entretanto, são extremamente tóxicos para os animais aquáticos e tem um custo elevado.

Segundo Brogdon (1998), todas as classes de inseticida apresentam resistência, o que provoca a reemergência das doenças transmitidas por vetores. Utilizando-se a combinação de inseticidas com diferentes mecanismos de ação, pode-se reduzir a chance de aparecimento de resistência (FERRARI, 1996 apud BRAGA; VALLE, 2007).

Novos produtos vêm ganhando destaque no controle de vetores, como os reguladores de crescimento e os inseticidas biológicos, ou bioinseticidas (BRAGA; VALLE, 2007). Os reguladores de crescimento mais utilizados pertencem ao grupo das benzoil-feniluréis (BPU), que são análogos do hormônio juvenil de insetos (AHJ). Em geral apresentam altos níveis de atividade e eficácia no controle de várias espécies em diferentes hábitat (MULLA; DARWAZEH; SHREIBER, 1989). As BPU inibem a síntese de quitina (POST, 1974 apud BRAGA e VALLE, 2007). Os AHJ atuam sobre o desenvolvimento dos insetos impedindo a emergência dos adultos (MIAN, 1982 apud BRAGA e VALLE, 2007). No grupo dos AHJ consta o *Pyriproxyfen*, que é recomendado pela OMS no combate a mosquitos vetores para uso em água para beber (WHO, 2007), sendo inclusive utilizado no Brasil no combate ao mosquito *Aedes aegypti* (BRASIL, 2014).

Na década de 1970 foram descobertas espécies de bactérias efetivas contra insetos de importância médica, principalmente Culicídeos (mosquitos) e Simulídeos (borrachudos). (BRAGA e VALLE, 2007). Os Culicídeos são maiores do que os Simulídeos, mais delgados e de coloração mais clara. Enquanto os Culicídeos se alimentam sugando sangue, os Simulídeos tem um aparelho bucal mastigador que dilacera a pele antes de sugar o sangue. As asas dos Culicídeos apresentam padrões, enquanto as dos Simulídeos são lisas e transparentes. As pernas e antenas dos Simulídeos são curtas, quando comparadas com as dos Culicídeos (ESTRANHO, 2016).

Entre os inseticidas biológicos (bioinseticidas), entre os mais eficazes e promissores para utilização a campo, destacam-se duas bactérias esporuladas do gênero *Bacillus*: o *B. thuringiensis* Berliner var. *israelensis* (Bti) e o *B. sphaericus* (Bs) Meyer e Neide (WHO, 1980b apud GERMANI, 1993). Segundo Des Roches e Garcia (1984 apud GERMANI, 1993), o *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide (Bs) apresenta linhagens muito tóxicas contra as larvas de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, porém, possui ação restrita contra as larvas da maioria das espécies de *Aedes*, não sendo, portanto, focado no presente trabalho.

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram-positiva (FEITELSON, 1993 *apud* EL-BENDARY, 2006) e o *Bacillus sphaericus* (Bs) é uma bactéria aeróbica em formato de bastão, formadora de endósporo terminal inchado ou subterminal (GORDON et al, 1973 *apud* EL-BENDARY, 2006).

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o agente de controle biológico de maior sucesso comercial e de uso mais extensivo no mundo (KERJA, 1993), pelos motivos listados a seguir:

- 1) A alta eficácia de suas proteínas inseticidas;
- 2) A existência de uma diversidade de proteínas que são efetivas contra um largo espectro de pragas importantes;
- 3) A sua segurança relativa aos parasitas e predadores não-alvos;
- 4) A facilidade de produção em massa;
- 5) A adaptabilidade da formulação convencional e tecnologia de aplicação.

Adicionalmente, utilizando-se técnicas de biologia molecular foi possível criar plantas transgênicas com resistência aos insetos, contendo genes de *Bacillus thuringiensis*. O Bt é uma bactéria formadora de esporo que pode ser prontamente isolada de vários habitats incluindo solo, água, plantas, insetos mortos e fezes de insetos. Seu ciclo de vida é simples, pois quando os nutrientes são suficientes para seu crescimento, o esporo germina produzindo uma célula vegetativa que cresce e se reproduz por fissão binária. A bactéria continua a se reproduzir até que um ou mais nutrientes em seu meio se tornem insuficientes para seu crescimento vegetativo. Nestas condições, a bactéria esporula produzindo um esporo e um corpo parasporal, este último composto primariamente de toxinas proteicas com ação inseticida, tipicamente formadas como inclusões cristalinas (FEDERICI, 1999).

Estas toxinas, conhecidas como endotoxinas, ocorrem no corpo parasporal como protoxinas, e após sua ingestão pelas larvas dos insetos, dissolvem-se, sendo convertidas em toxinas ativas através de clivagem por enzimas proteolíticas no intestino médio do inseto. As toxinas ativadas se ligam à membrana microvilar em insetos sensíveis, lisam a célula e destroem muito do epitélio intestinal, causando a morte do inseto. Existem mais de 60 subespécies de Bt, distinguidas umas das outras em base de diferenças imunológicas em serotipo flagelar. A serotipagem flagelar tem ajudado a classificar os isolados, mas se mostrou não confiável para prever a atividade inseticida, portanto, é essencial que o espectro de toxicidade de novos isolados seja determinado através de bioensaios (FEDERICI, 1999).

El-Bendary (2006) diz que de acordo com Rowe e Margaritis (1987) e WHO (1999), nove diferentes toxinas tem sido descritas em linhagens de Bt, e estas toxinas estão descritas na Tabela 2. Dentre as várias toxinas produzidas, a δ -endotoxina tem recebido especial atenção para a produção de bioinseticidas em escala comercial. Ela forma cristais de diferentes formas – bipiramidal, cuboidal, rombóide plano, ou um composto de dois ou mais tipos de cristal.

Tabela 2 – Toxinas descritas em linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Toxina	Comentário
α -exotoxina	Fosfolipase C
β -exotoxina	Exotoxina termoestável
γ -exotoxina	Tóxica a insetos da subordem Symphyta (moscas-serra).
δ -endotoxina	Proteína Cristal Parasporal
Exotoxina fator piolho	Ativa apenas contra piolhos
Exotoxina fator rato	Tóxica contra ratos e <i>Lepidoptera</i>
Toxina solúvel em água	
Vip3A	Proteína inseticida vegetativa Bt
Enterotoxina	Produzida por células vegetativas

Fonte: EL-BENDARY, 2006.

As toxinas cristalíferas (δ -endotoxina) pertencem a dois grupos estruturalmente diferentes: a família *Cry*, com atividade citolítica específica, e a família *Cyt*, que é não específica citolítica e hemolítica. (WHO, 1999)

De acordo com DE BARJAC (1990), PRIEST (1992), PORTER (1996), WHO (1999), SIEGEL (2001), ABDULLAH (2002) e MITTAL (2003), Bt e Bs são completamente seguros a outros organismos não-alvo, aos seres humanos, animais, vida selvagem e meio ambiente, sendo adequados ao uso comunitário (EL-BENDARY, 2006).

O *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) apresenta três toxinas *Cry* diferentes e uma *Cyt*. Ocorre um sinergismo de ação, como se estivessem sendo utilizados vários compostos de mecanismos de ação diferentes (DELECLUSE et al, 2000 apud POLANCZYK et al, 2003). Segundo Chui et al (1995), o Bti pode ser usado juntamente com produtos químicos para diminuir a chance de resistência e aumentar a eficiência do controle de insetos vetores.

O Rio Grande do Sul foi pioneiro no uso do Bti no Brasil, com o programa de controle de Simulídeos iniciado em 1983, para controlar populações de *Simulium pertinax* resistentes a Temephós (RUAS NETO, 1984 apud POLANCZYK et al, 2003). Atualmente, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia realiza os últimos testes toxicológicos do seu novo bioinseticida baseado em Bti, chamado Inova-Bti. É uma formulação líquida que pode ser adicionada em locais que acumulem água ou tenham potencial de serem criadouros de

mosquitos *Aedes aegypti*. No momento, está aguardando registro junto à ANVISA e é o segundo produto à base de Bti desenvolvido pela Embrapa. O primeiro chamado *Bt-horus*, lançado em 2005 em parceria com uma empresa de biotecnologia não é produzido em larga escala. O volume de produção inicial é de 1.600L de Inova-Bti por semana, o suficiente para abastecer 53 mil residências com frascos (unidades) de 30mL, com um custo unitário de R\$ 3 a R\$ 4 (EMPRAPA, 2016; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016).

O desenvolvimento e as etapas de produção de um bioinseticida são muito diferentes das rotas mais convencionais dos inseticidas químicos, que dependem de técnicas químicas tradicionais. Tem início pela seleção do microrganismo, quando se busca encontrar uma linhagem que se destaque pela eficácia e/ou produtividade. Após esta etapa, ocorrem os ensaios de otimização, visando a obtenção de um isolado microbiano que mantenha as características inseticidas desejadas durante um grande número de gerações, garantindo que durante a produção comercial a linhagem não reverta a um isolado menos ativo. Após, se determinam as condições ótimas de fermentação (biossíntese) em biorreator para assegurar que o isolado bacteriano produza no seu máximo potencial (BRYANT, 1994).

O processo de fermentação envolve um crescimento escalonado de células de Bt sendo o método mais utilizado o processo submerso em biorreator fechado, onde um meio líquido é utilizado para suspender e propagar a biomassa. Todo o equipamento deve ser esterilizado para evitar contaminação microbiana e manter as condições assépticas estritas ao longo de todo o processo (BRYANT, 1994).

O biorreator em escala de produção vai permitir um crescimento continuado do número de células via crescimento vegetativo do Bt. Os esporos e cristais não são produzidos até o estágio final de fermentação, quando ocorre a limitação de recursos nutricionais e o crescimento progride até a fase de esporulação. As células se lisarão eventualmente para liberar o cristal e o esporo no meio de cultura (BRYANT, 1994).

A recuperação das toxinas do Bt envolvem a purificação e concentração do caldo de fermentação. É uma fase crítica onde a potência do produto pode ser reduzida severamente por um *design* de processo de recuperação inadequado. Primeiramente deve-se fazer a remoção de grandes detritos como células e meio de cultura, por ultrafiltração, *screening* ou centrifugação. O produto é então processado por centrifugação ou evaporação, para aumentar a potencia do caldo obtido e formar um concentrado aquoso (BRYANT, 1994).

Na fase de formulação de um produto líquido, são adicionados adjuvantes como estabilizantes, anti- evaporantes ou aditivos como estimulantes de alimentação. As formas líquidas são menos estáveis do que as secas e se um pó molhável, grânulo molhável ou líquido baseado em óleo será produzido, um passo a mais de secagem é requerido (BRYANT, 1994).

Um produto comercial à base de cristais de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* no mercado é o Teknar®, da empresa Syngenta, apresentando-se como uma solução aquosa concentrada à 1,6% (SYNGENTA, 2016).

2 OBJETIVOS

O foco principal deste trabalho é o combate ao mosquito *Aedes aegypti*, tendo os seguintes objetivos gerais e específicos:

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho é fazer uma proposta para produção e formulação de bioinseticida, baseado em toxinas de *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)*, para combater o mosquito *Aedes aegypti*, adequado às condições brasileiras.

2.2 Objetivos Específicos

1. Obter um produto bioinseticida efetivo contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, comprovado pelos testes de atividade larvicida;
2. Propor uma produção economicamente viável e em larga escala, utilizando-se matérias-primas regionais;
3. Otimizar os processos de isolamento, concentração e purificação das toxinas e cristais;
4. Propor a formulação do bioinseticida, considerando os problemas de estabilidade e retenção da atividade contra o inseto-alvo no ambiente;
5. Propor o controle de qualidade do produto final a ser realizado.

3 METODOLOGIA

3.1 PRODUÇÃO

O microorganismo utilizado na produção é a cepa IPS-82 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, (Bti) obtido do Instituto Pasteur, França.

O meio de cultivo padrão utilizado é composto de triptose, glicose, cloreto de sódio e fosfato de sódio bibásico, que será chamado de meio de cultura TGP. É frequentemente usado para o crescimento de Bt, mas menos satisfatório que o meio Ágar Nutriente contendo peptona e extrato de carne (WHO, 1990).

A produção de δ -endotoxina parece ser controlada por plasmídeos que podem ser perdidos, depois de repetidas repicagens. Para evitar a chance de perda de atividade, recomenda-se a liofilização para preservação. É muito importante testar a viabilidade da cultura antes de utilizar uma amostra reconstituída para iniciar o processo de produção em biorreator (WHO, 1990).

A manutenção das culturas puras de *Bacillus thuringiensis israelensis* será realizada conforme recomendações da World Health Organization (1990). A bactéria será cultivada em grande quantidade, a 30°C por 24h em meio TGP, e depois será liofilizada em tubos e armazenada em refrigerador. A partir de um cultivo liofilizado reativado, serão semeados os tubos de ágar inclinado, constituindo os estoques das culturas de trabalho para uso nas fermentações posteriores. Isso reduzirá as chances de perda de plasmídeos e por consequência, de perda de produção da endotoxina de interesse nos repiques dos tubos com ágar inclinado. Os cultivos de Bti em tubos contendo 10 mL de meio Agar TGP descrito na Tabela 3, serão incubados à 30°C por 24h, e após armazenados em geladeira à 4°C.

Tabela 3 – Composição do Meio TGP

Componente	Concentração
Triptose	20,0 g.L ⁻¹
Glicose	2,0 g.L ⁻¹
NaCl	5,0 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	2,5 g.L ⁻¹
Agar	20,0 g.L ⁻¹

Fonte: DULMAGE, 1990.

Para a implantação da planta de produção, deverão ser providos os equipamentos e instalações essenciais listados a seguir:

1. Dornas de fermentação (3) fechadas e com capacidade adequada ao volume de bioinseticida a ser produzido, construídas em aço inox 304;
2. Compressores (3) para fornecimento de ar comprimido sem óleo, água e partículas suspensas, com volume (vvm) necessário ao processo;
3. Tanques para produção do inoculo bacteriano (3) e de nutrientes estéreis para o processo em escala industrial;
4. Instalação para captação e tratamento de água para a utilização em todas as etapas industriais;
5. Instalação para geração de vapor de água para a esterilização dos tanques e dornas e outros materiais e equipamentos;
6. Equipamentos para filtração, centrifugação, purificação, diluição, formulação e embalagem dos produtos bacterianos;
7. Equipamentos e instalações para remoção de resíduos sólidos e tratamento dos efluentes líquidos;
8. Capital para aquisição de terreno, aluguel de instalações, aluguel de equipamentos de escritório, manutenção de equipamentos, veículos, capital de giro e mão-de-obra.

As condições do suprimento de água na planta de produção do bioinseticida devem ser levadas em alta consideração no projeto, devido ao grande consumo de água de qualidade e com o grau de pureza necessárias. Um suprimento de água dura com alta concentração de cátions divalentes, requer uma estação de pré-tratamento para diminuição desse teor, para não danificar os equipamentos. Outra questão é a da manutenção da temperatura, pois para o controle ideal do processo de biossíntese, que é exotérmico e ocorre a 30°C, a temperatura ideal para a água de refrigeração é de 15°C (WHO, 1990).

O meio de produção a ser utilizado tem por base o soro de queijo, subproduto da fabricação do queijo, que mostrou resultados promissores na produção do Bti, conforme Silveira (1998). É uma matéria-prima barata e abundante que pode ser obtido diretamente das indústrias, tendo sua composição descrita na Tabela 4. Na preparação do meio de cultura deve-se hidrolisar a lactose, visto que o Bti não a utiliza como substrato. Acidifica-se o soro até o pH 1,0, e ferve-se por 10 minutos, neutraliza-se com hidróxido de sódio 2,0 N e filtra-se até líquido límpido. A seguir, adicionam-se os sais na forma de sulfatos (Tabela 5) e o

antiespumante Dow Corning® Antifoam M, em concentração mínima necessária para evitar que ocorra uma formação prejudicial de espuma durante a fermentação. O meio de cultivo (mosto) será composto por metade deste soro preparado e metade com água de qualidade adequada. O meio deve ser esterilizado, dependendo da etapa se bancada ou industrial, por autoclave ou mecanismo industrial.

Os tempos de esterilização devem ser experimentalmente determinados para o meio de cultivo, pois os sólidos se acumulam no fundo, e a penetração do calor no sedimento é lenta. O tempo de esterilização é estimado entre 1h30min a até 2h, dependendo do teor de sólidos (DULMAGE, 1990).

O soro de queijo obtido pela coagulação química ou enzimática do leite pasteurizado, é composto por lactose, sais de cálcio e proteínas, conforme explicitado na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição Centesimal média do Soro de Queijo, após a coagulação enzimática e química do leite de bovinos

Composição	%
Água	92,0 – 93,0
Extrato Seco	6,5 – 7,3
Gordura	0,1
Caseína	0,7 – 0,9
Albumina	1,0
Sais Minerais	0,3 – 0,6
Lactose q.s.p.	100,0

Fonte: Cooperativa Central Gaúcha de Laticínios (CCGL) *apud* SILVEIRA, 1998.

Tabela 5 – Sais adicionados ao meio de cultura

Componente	Concentração
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,30 g.L ⁻¹
MnSO ₄ . H ₂ O	0,02 g.L ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,02 g.L ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,02 g.L ⁻¹

Fonte: SILVEIRA, 1998.

A preparação do inóculo inicia com a cultura do Bti liofilizado recuperada, que será semeada em ágar TGP inclinado e incubada a 30°C por 24h. A partir do crescimento em ágar TGP inclinado, será transferida uma alçada de material para um frasco de 500 mL contendo 100mL de caldo TGP, que será incubado em agitador orbital à 340 rpm por 6-8h. Após, 13mL deste cultivo serão transferidos assepticamente para um frasco de Erlenmeyer de 2000mL contendo 670mL de caldo TGP, para incubação nas mesmas condições anteriormente descritas. O cultivo deste segundo frasco é utilizado para inocular assepticamente o

biorreator de 5000L, na proporção de 0,5% v/v, usando um instrumento estéril. O esquema pode ser visualizado na Figura 2.

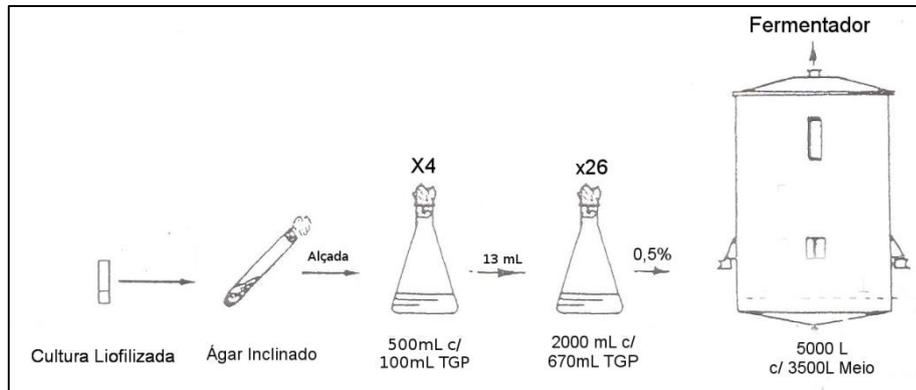


Figura 2: Preparação do inoculo para produção.

Na Tabela 6 estão descritas as especificações de três equipamentos de fermentação utilizados para produção do Bti, com o respectivo gasto de recursos.

Tabela 6 – Especificações para Fermentadores de Diferentes Tamanhos

Tamanho do Fermentador	50 L	500 L	5000 L
Especificação			
Vapor (kg/h)	23	90	640
Água (L/min)	15	45	150
Ar (m ³ /min) (CNP)	0,079	0,59	3,8
Eletricidade (kW)	4	11	40

Fonte: DULMAGE, 1990.

As condições de desenvolvimento do Bti no biorreator são agitação de 400rpm, taxa de aeração de 1,0 vvm e temperatura $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Em cada etapa de biossíntese, será retirada uma alíquota de 10mL para determinação do crescimento, grau de esporulação, pH, absorvância e, principalmente, ausência de contaminação microbiana.

O ar utilizado para a aeração deve ser estéril, e podem ser utilizados filtros de acetato de celulose, de fibra de vidro ou de cerâmica, com tamanho de poro não menor que 0,5 μm . A esterilização do equipamento será realizada junto com o meio de cultivo e a esterilização dos filtros ocorrerá junto com o fermentador (DULMAGE, 1990).

Para o controle adequado do processo, anexados ao fermentador temos sondas de espuma, de pH, de temperatura, de oxigênio dissolvido, e um visor para observação do processo.

A fase log de crescimento do Bti dura de 16 à 18h, e a esporulação é completa em 20 à 24h, com a lise total ocorrendo entre 35 à 40h (DULMAGE, 1990), quando se encerra o ciclo de produção.

3.2 RECUPERAÇÃO

A recuperação das proteínas cristalíferas e dos cristais é feita por centrifugação e filtração em vácuo, em escala de bancada. Um modelo de centrífuga que gere em torno de 27,300G, após 30 minutos será capaz de prover uma excelente recuperação dos cristais protéicos (DULMAGE, 1990). O processo de recuperação é realizado segundo o descrito por Dulmage *et al.* (1970), explicitado em forma de esquema na Figura 3.

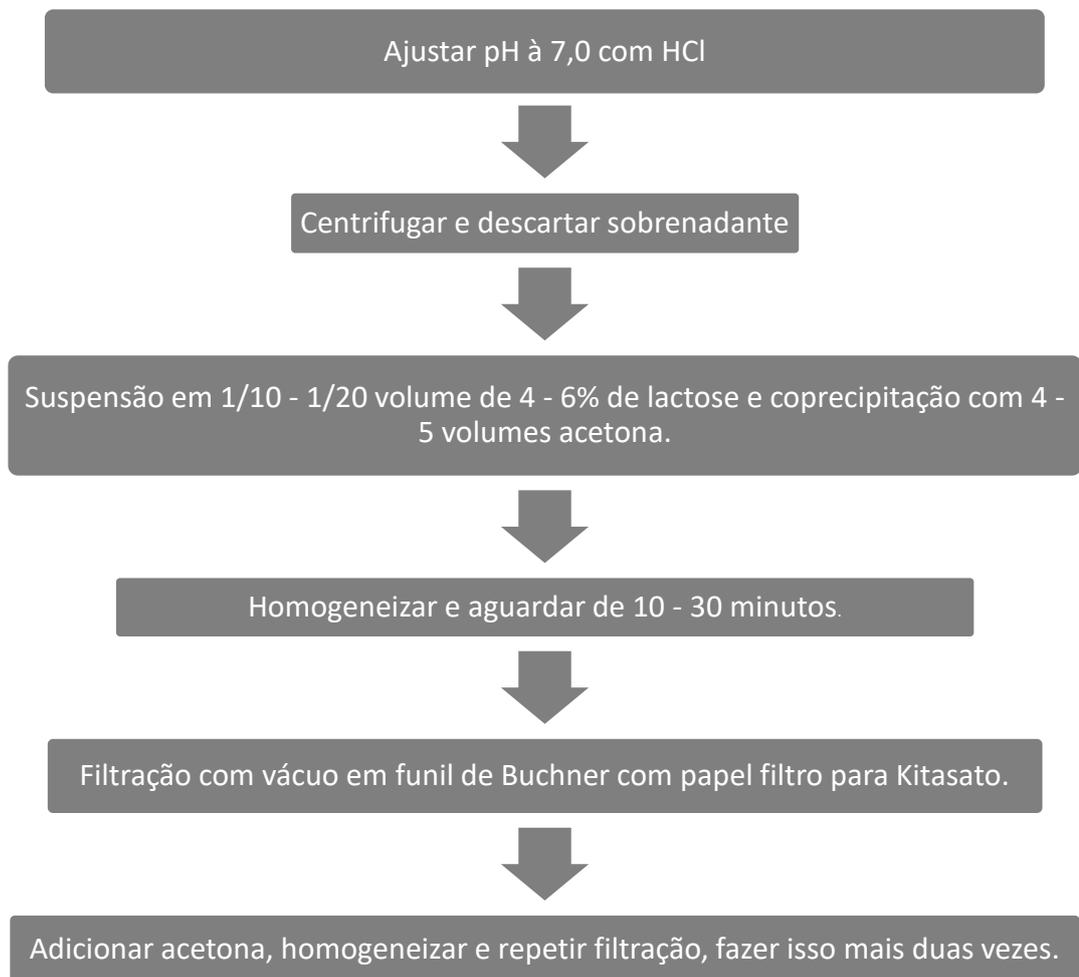


Figura 3: Esquema de co-precipitação com lactose e acetona, por Dulmage et al (1970 *apud* DULMAGE 1990).

Os tratamentos finais com acetona têm o objetivo de remover água, e depois de completado o processo, os cristais serão secos em estufa.

Em nível de produção industrial, uma centrífuga de fluxo contínuo tubular cilíndrica CEPA Z61 (Figura 4) será utilizada, com volume de operação de 30 – 200 L, com produção

máxima de 1500L/h quando o meio é aquoso (o valor real será diferente de acordo com o líquido) e capacidade de 6L de sólidos (TEKNISCIENCE, 2016). A determinação da velocidade de alimentação ótima para a centrífuga deve ser determinada experimentalmente.



Figura 4: Centrífuga CEPA Z61G (TEKNISCIENCE, 2016).

Os sólidos coletados serão secos em *spray-dryer*, e deverá ser feita a adequação da alimentação. O processo, segundo DULMAGE (1990), está esquematizado na Figura 5.

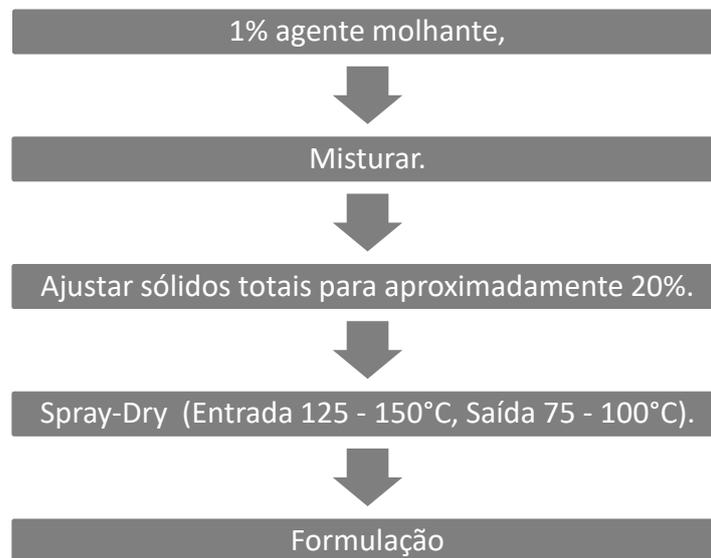


Figura 5: Esquema para *Spray-Drying* (DULMAGE, 1990).

3.3 FORMULAÇÃO

Propõe-se uma formulação de briquete flutuante que permita a liberação controlada do bioinseticida, durante um período prolongado de tempo, para ser aplicado em fontes de água e agir como larvicida de efeito residual elevado.

A formulação deverá dispensar o bioinseticida próximo à superfície da água, e exibir um grau adequado de flutuabilidade e dispersibilidade. Será utilizada uma formulação que se desintegre por efervescência, composta dos itens presentes na Tabela 7, similar à proposta na patente de Bradbury, Quinland e Most (1990).

Tabela 7 – Itens da formulação Briquete flutuante

Classe	Adjuvante
Pesticida	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
Iniciadores de Efervescência	Ácido cítrico e bicarbonato de sódio
Dispersante	Dioctilsulfosuccinato
Desintegrante	Polivinilpirrolidona
Flutuante	Sílica coloidal
Binder	Celulose microcristalina

Fonte: BRADBURY; QUINLAND; MOST, 1990.

A granulação por via seca é um processo de formulação do inseticida biológico, adicionado de compostos efervescentes e do dispersante, e contendo um aglutinante não aquoso como polietilenoglicol 4000 (BRADBURY, QUINLAND, MOST, 1990). A mistura homogeneizada formada é passada por um compactador de rolos, que formará o briquete ou lingote conforme mostrado abaixo na Figura 6.



Figura 6: Compactador de Rolos.

3.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Em cada etapa da produção, devem ser realizadas análises de microscopia óptica do meio de cultivo e do produto final, para verificar ausência de microrganismos contaminantes, de células bacterianas em crescimento e de formação de esporos. Os testes de crescimento serão realizados em placas de Petri, para assegurar a ausência de bactérias patogênicas contaminantes, sendo as principais listadas na Tabela 8 (DULMAGE, 1990).

Tabela 8 – Bactérias patogênicas que devem estar ausentes

Staphylococcus spp.

Streptococcus spp.

Escherichia coli

Pseudomonas spp.

Shigella spp.

Salmonella

Clostridium spp.

Bacillus spp. (que não Bti)

Fonte: DULMAGE, 1990.

Também devem ser realizados testes *in vivo*, para garantir que não há presença de outras bactérias além de Bti, conforme descrito a seguir:

Seis camundongos de 20g devem ser inoculados com injeção subcutânea de 10^6 esporos de Bti, e observados por 7 – 21 dias. Se um camundongo morre, ou se desenvolvem lesões ou são observados quaisquer sinais de doença, o lote deve ser rejeitado até ser averiguado se a causa da morte se deve à má formulação ou a erro experimental (DULMAGE, 1990).

Bioensaios também devem ser realizados, conforme descrito na Seção 7, sendo o desvio de potência um possível indicador de contaminação microbiana (DULMAGE, 1990).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

Os bioensaios para determinação da atividade larvicida serão realizados segundo as técnicas descritas por Dulmage (1990) e Silveira (1998), explicitados a seguir: transferem-se assepticamente 0,4g de amostra seca obtida da biossíntese, para tubos contendo 19,6 mL de água deionizada. A suspensão formada transfere-se para um béquer de 150 mL, submete-se a sonicação por 1 minuto a 50hz em banho de gelo. Fazem-se diluições decimais sucessivas até a diluição 10⁻⁸, homogeneizando-se os frascos em movimento circular por 1 minuto. Transferem-se 25 larvas para cada um dos quatro copos contendo 40 mL de água destilada, e completa-se a 50mL. De cada diluição das suspensões decimais, transferem-se 10mL para copos plásticos de 100mL contendo 39mL de água destilada, aos quais será transferido o conteúdo dos copos de 50mL contendo as larvas. O teste será realizado em triplicata em três dias diferentes, e com um grupo controle contendo apenas água e ração. Todos os copos com as larvas serão incubados a 25±2°C, e as leituras de larvas mortas realizadas após 24h. A análise estatística preconizada para determinação da CL50 é a Análise de Probitos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção poderia se beneficiar do uso de uma nova cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* mais produtiva ou que apresentasse maior eficiência larvicida de seus cristais protéicos que a IPS-82. Porém, isso exigiria uma etapa longa e custosa de *screening* na natureza, e que poderia trazer resultados negativos com nenhuma nova linhagem de Bti isolada apresentar atividade superior à IPS-82, ou aquisição de outra fonte acreditada.

Após a obtenção da cultura pura do Bti e de sua a propagação conforme a seção 3.1, teremos uma grande quantidade de Bti liofilizada e tubos de ágar inclinado com meio TGP com a bactéria crescida estocados à 4°C em refrigerador.

Okzan (2003) indica que a lactose estimula a produção de δ -endotoxina, e, portanto, um experimento interessante seria avaliar o incremento na produção do Bti pela adição de soro de queijo não hidrolizado ao mosto, e verificar a atividade larvicida do produto obtido.

Comprovou-se que determinados íons são essenciais para a produção da toxina pelo Bt. Assim, o Potássio é essencial para a produção de toxinas pelo Bt, e os íons metálicos são essenciais para a maior esporulação e produção de δ -endotoxina pelo Bt. Isso justifica a suplementação de sais no mosto e sua lista está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Íons essenciais para a produção de toxina

K^+
PO_4^{3-}
Ca^{2+}
Mg^{2+}
Mn^{2+}
Zn^{2+}
Cu^{2+}
Fe^{2+}

Fonte: EL-BENDARY, 2006.

A aeração do meio de produção é muito importante para o desenvolvimento do *Bacillus thuringiensis* e não ocorrerá crescimento ou esporulação com níveis baixos de aeração (FODA et al, 1985 *apud* EL-BENDARY, 2006).

As formulações do bioinseticida em forma sólida apresentam vantagens como o menor custo com transporte e a menor necessidade de preservantes. A desvantagem principal está na etapa de secagem, que é um dos pontos críticos do processo, causando

perda de atividade e um custo a mais de produção. A estabilidade da formulação do produto relaciona-se diretamente com a incidência de luz solar e com a radiação UV, causando significativa diminuição da atividade (BRAR et al., 2006). Este obstáculo pode ser contornado com o uso de um flutuador de plástico, como o das pastilhas de cloro para águas de piscinas de recreação.

O resultado final seguindo-se adequadamente os parâmetros de produção e formulação será um produto biológico com atividade inseticida adequada, que depois de aprovado no controle de qualidade, deverá ser embalado, registrado e licenciado, e poderá ser utilizado com sucesso no controle do mosquito *Aedes aegypti*.

5 CONCLUSÕES

A recente epidemia de vírus Zika demonstrou que o controle biológico de seu vetor é muito importante é necessário;

A Dengue e a Zika são doenças sérias que exigem o comprometimento das comunidades para a eliminação de criadouros;

A aplicação de bioinseticidas na água e criadouros é um meio eficaz para prevenir a reprodução dos mosquitos;

Os bioinseticidas apresentam como principais vantagens intrínsecas a especificidade contra os insetos-alvo, o baixo dano aos demais insetos, outros organismos vivos e ao meio ambiente;

Os bioinseticidas tem produção tecnologicamente acessível e simplificada de ser realizada, sendo economicamente viáveis pela utilização de matérias-primas oriundas de resíduos agroindustriais;

Os bioinseticidas são fáceis de utilizar em campanhas de saúde pública mesmo em pequenos municípios, não necessitando de pessoas qualificadas para realizar a aplicação;

Os bioinseticidas não requerem equipamentos de proteção individual para sua aplicação, em contraste com os “fumacês”, e sua persistência no ambiente chega a um mês com uma aplicação;

Os bioinseticidas apresentam apenas a desvantagem de seu preço mais elevado;

As tecnologias de produção de bioinseticidas estão disponíveis há muitos anos, sendo importante que o País se torne o produtor dos inseticidas que usa, e que desenvolva novos produtos e formulações para o combate aos insetos vetores;

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde (Org.). **Dengue, Chikungunya e Zika: Prevenção e Combate**. 2016. Disponível em: <<http://combateaedes.saude.gov.br/index.php/tira-duvidas>>. Acesso em: 07 maio 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de Aedes aegypti**. 2014. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2016.

CHAVASSE, D. C; YAP, H.H. World Health Organization. **Chemical Methods for the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance**. 1997. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63504/1/WHO_CTD_WHOPES_97.2.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

DULMAGE, T. World Health Organization. **Guidelines for Production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus**. 1990. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/61645>>. Acesso em: 26 maio 2016.

EMBRAPA. **Nova geração de bioinseticida contra Aedes aegypti está em fase final de produção**. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9863743/nova-geracao-de-bioinseticida-contra-aedes-aegypti-esta-em-fase-final-de-producao>>. Acesso em: 15 maio 2016.

ESTRANHO, Mundo. **Qual a diferença entre Pernilongo e Borrachudo?** 2016. Disponível em: <<http://mundoestranho.abril.com.br/materia/qual-a-diferenca-entre-pernilongo-e-borrachudo>>. Acesso em: 21 maio 2016.

FUNASA. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde. **Controle de Vetores: Procedimentos de Segurança**. Brasília, 2001. 208 p.

GERMANI, José Carlos. **Produção de *Bacillus sphaericus* S2 com Materias-Primas Regionais e Avaliação de sua Atividade Larvicida**. 1993. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

MARCONI EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIO. **Fermentador/Reator em Vidro**. Disponível em: <<http://www.marconi.com.br/capa.asp?idpaginainst=exibeproduto&procodigo=294>>. Acesso em: 28 ago. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Ministra defende uso de inseticida biológico para controle do *Aedes aegypti***. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/02/ministra-defende-uso-de-inseticida-biologico-para-controle-do-aedes-aegypti>>. Acesso em: 15 maio 2016.

PAHO. Pan American Health Organization. **Vector Born Diseases in the Regions of the Americas**. 2013. Disponível em: <http://ais.paho.org/hip/viz/cha_cd_vectorborndiseases.asp>. Acesso em: 17 maio 2016.

PAULO, Folha de São. **Campinas registra caso de vírus zika após transfusão de sangue**: 16/12/2015. 2015. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2015/12/1719589-campinas-registra-caso-de-virus-zika-apos-transfusao.shtml>>. Acesso em: 19 maio 2016.

PORTAL BRASIL. **Saiba mais informações sobre a vacina da dengue**. 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/saiba-mais-informacoes-sobre-a-vacina-da-dengue-1>>. Acesso em: 20 maio 2016.

PORTAL DA SAÚDE. **Casos de Dengue: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2014**. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Dengue-at---2014.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2016.

PORTAL DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica Dengue**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>>.

Acesso em: 15 maio 2016.

SÃO PAULO. SP Notícias. Portal do Governo de São Paulo. **Saiba como estão os últimos testes da 1ª vacina brasileira contra a dengue**. 2016. Disponível em:

<<http://saopaulo.sp.gov.br/spnoticias/lenoticia2.php?id=245951&c=6>>. Acesso em: 20 maio 2016.

SYNGENTA. **Ficha Técnica Teknar**. 2016. Disponível em:

<http://www.nucleosaudeambiental.com.br/imagens/Produtos/2362009_152404_teknar_f_tecnica.pdf>. Acesso em: 21 maio 2016.

TEKNISCIENCE. **Cepa.pdf** Disponível em:

<<http://www.tekniscience.com/documents/CEPA.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**: Report of a meeting of the

WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. 2010. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

WHO. World Health Organization. **Dengue**: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention

and Control. 2009. Disponível em:

<<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2016.

WHO. World Health Organization. **Malaria Control Today**: Current WHO Recommendations.

2005. Disponível em: <www.who.int/malaria/publications/mct_workingpaper.pdf>. Acesso

em: 20 maio 2016.

WHO. World Health Organization. **Microbial Pest Control Agent Bacillus thuringiensis**. 1999. Disponível em: <www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/EHC217.PDF>. Acesso em: 20 maio 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mosquitocontrol: can it stop Zika at source?** 2016 Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/articles/mosquito-control/en/>>. Acesso em: 12 maio 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pyriproxyfen in drinking water**. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/pyriproxyfen2ndadd.pdf>. Acesso em: 12 maio 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Mosquito**. 2016. Disponível em: <www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/>. Acesso em: 12 maio 2016.

BRADBURY, Roderick Stephen; QUINLAND, Raymond John; MOST, Brian Harold. **Pesticidal composition for water treatment**: Patente EP 0235875 B1. 1990. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/EP0235875B1?cl=en>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

BRAR, Satinder K. et al. **Recent advances in downstream processing and formulations of Bacillus thuringiensis based biopesticides**. Process Biochemistry, [s.l.], v. 41, n. 2, p.323-342, fev. 2006. Elsevier BV.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRYANT, J. E. Commercial production and formulation of Bacillus thuringiensis. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 49, p. 31–35, 1994.

CHRISTOPHERS, S. R. **Aedes aegypti (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics and structure.** London: Press, Cambridge University, 1960.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1051, 2015.

EL-BENDARY, M. A. Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus biopesticides production. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 158–170, 2006.

FOY, B. D. et al. Probable Non – Vector-borne Transmission of Zika Virus , Colorado , USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRANGEUL, L. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **Plos Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A Bacterial Spore Demonstration Rapid Larvicidal Activity Against Anopheles sergei unguilata, Culex univittata, Aedes aegypti and Culex pipiens. **Mosquito News**, v. 37, n. 3, p. 355–358, 1977.

GOURINAT, A. et al. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue : Challenges to Molecular Biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476–481, 1983.

HARADA, T. et al. Toxicity and Carcinogenicity of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). **Toxicological Research**, v. 32, n. 1, p. 21–33, 2016.

HILLS, S. L. et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States , 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report Transmission**, v. 65, n. 8, p. 215–216, 2016.

KERJA, C. **Bacillus thuringiensis**. [s.l: s.n.]. v. 5

MULLA, M. I. R. S. et al. Field Evaluation of the Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 Against Floodwater Mosquitoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1288–1293, 1982.

MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A.; SHREIBER, E. T. Impact of New Insect Growth Regulators and Their Formulations On Mosquito Larval Development in Impoundment and Floodwater Habitats. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 1, p. 15–20, 1989.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, v. 68, p. 53–55, 2015.

PITISUTTITHUM, P.; BOUCKENOOGHE, A. The first licensed dengue vaccine : an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection The first licensed dengue vaccine : an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. **Expert Review of Vaccines**, n. May, 2016.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA MDE, O.; ALVES, S. B. [Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*]. **Rev Saude Publica**, v. 37, n. 6, p. 813–816, 2003.

TAUIL, P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, 2002.

TURUSOV, V. et al. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 2, p. 125–128, 2002.

V. W. D. CHUI; TSOI, K. W.; KONG, H. CONTROL OF MOSQUITO LARVAE (DIPTERA : CULICIDAE) USING BTI AND TEFLUBENZURON : LABORATORY EVALUATION AND SEMI-FIELD. **Environment International**, v. 21, n. 4, p. 433–440, 1995.