

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

ADEMIR TRAMONTINI SCHMITT

**AVALIAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis israelensis* EM NOVO FORMULADO
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

PORTO ALEGRE

2018

Ademir Tramontini Schmitt

**AVALIAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis israelensis* EM NOVO FORMULADO
PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^(a). Dr^(a). Onilda Santos da Silva

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Tramontini Schmitt, Ademir
Avaliação de *Bacillus thuringiensis israelensis* em
novo formulado para o controle de larvas de *Aedes*
aegypti / Ademir Tramontini Schmitt. -- 2018.
71 f.
Orientadora: Onilda Santos da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Bacillus thuringiensis israelensis*. 2. *Aedes*
aegypti. 3. Controle Biológico. 4. Microbiologia. 5.
Saúde Pública. I. Santos da Silva, Onilda, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Unless we change our way of thinking, we will not be able to solve the problems caused by the way we get used to seeing the world”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, pois sem ele eu não teria chegado até aqui.

A UFRGS, ao seu corpo docente, direção e administração pelo excelente ambiente oferecido aos seus alunos e os profissionais qualificados que disponibiliza para nos ensinar.

Aos professores, em especial, a minha orientadora Onilda Santos da Silva, eu deixo uma palavra de agradecimento pela oportunidade, paciência e confiança que depositaram em mim.

Aos colegas de Laboratório pela ajuda, dedicação e parceria. Sem vocês eu jamais conseguiria concluir esta etapa.

A empresa Simbiose, em especial ao amigo Marcelo Godoy de Oliveira, pela confiança, compreensão e cobrança, pois sem dúvida estes aspectos foram de suma importância, não só para a conclusão desta etapa como no desenvolvimento profissional.

Aos meus avós, Leodomira Camargo Tramontini "in memoriam" e Valderi Tramontini, por todo esforço e incentivo.

Agradeço aos meus pais Rosiméri do Carmo Tramontini e Ademir Viau Schmitt que me deram apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

A minha irmã, Júlia, que sempre pacientemente compreende os momentos de dificuldade e sempre me fortalece.

Em especial a minha esposa Laís Carnhieto Schmitt, meu mais puro agradecimento, pela compreensão da minha ausência e principalmente por me fazer entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Também gostaria de agradecer a minha "pequena" Lívia, meu maior incentivo para a conclusão desta etapa.

Por fim, gostaria de deixar meu muito obrigado, a todos que de alguma forma participaram desta caminhada que agora se finda.

AVALIAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis israelensis* EM UM NOVO FORMULADO PARA O CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Autor: Ademir Tramontini Schmitt

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

RESUMO

Aedes aegypti é uma importante espécie de mosquito que pode transmitir vários tipos de arbovírus como os da dengue, febre amarela, Chikungunya, além do Zika vírus. Desta forma, o controle deste vetor é mundialmente importante, principalmente através do uso de inseticidas biológicos que permaneçam ativos por um longo período de tempo nos criadouros dos mosquitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito larvicida de um novo formulado de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) para o controle de larvas de *Ae. aegypti*. Para este teste 10 concentrações de *Bti* foram analisadas verificando a eficácia de mortalidade após 48h. Através de análises de regressão logística de Morte por log (dose (μ l)) e intervalos de confiança do modelo Probit foram determinadas as concentrações letais CL₅₀, CL₉₀ bem como foi determinado a Biopotência (UTI/ml) do formulado produzido. Também foram avaliados os efeitos residuais em ambientes secos e ambientes com água. Além destes, foram realizados testes complementares como, confirmação da presença de proteínas através da avaliação do peso molecular das proteínas por Eletroforese. Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Bti* durante o período de efeito residual. Os resultados demonstram que as CL₅₀ e CL₉₀ foram de 0,3 e 0,7 μ l/L respectivamente. A análise de determinação de potência utilizou como base a CL₅₀ de 0,013 mg/L do IPS82. Sendo assim a Potência do novo formulado de *Bti* ficou estipulada em 800 UTI/ μ l. Das 120 análises realizadas para a representação do efeito larvicida, 72 apresentaram mortalidade superior a 99% em 48h de exposição. Quanto ao efeito residual em ambientes com água, o novo formulado apresentou-se apto para a utilização até o 13º dia. Para ambientes secos o mesmo mostrou-se efetivo até o 30º dia de análise. Os pesos moleculares das proteínas encontradas foram compatíveis com os pesos das proteínas Cry10A, Cry11A, Cry4A, Cry4B. Durante a avaliação do efeito residual em locais com água a concentração de UFC/ml de água era de $1,00 \times 10^5$. No 4º dia a concentração era de $7,33 \times 10^4$ e após o 13º dia a concentração havia diminuído para $3,50 \times 10^3$ células por ml. O novo formulado de *Bti* mostrou-se apto para a comercialização, apresenta resultados efetivos no controle de larvas de *Ae. aegypti* permanecendo com característica virulenta tanto em ambientes com água quanto em ambientes secos, não apresenta influência da termovariação, manteve-se estável pelo período equivalente há três anos e não apresenta fitotoxicidade a plantas.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (71 p.) Agosto, 2018.

EVALUTION OF *Bacillus thuringiensis israelensis* A NEW FORMULATION FOR THE CONTROL OF *Aedes aegypti* LARVAE

Author: Ademir Tramontini Schmitt

Advisor: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

ABSTRACT

Aedes aegypti is an important mosquito species that can transmit various types of arboviruses such as dengue fever, yellow fever, Chikungunya, in addition to the Zika virus. In this way, the control of this vector is worldwide important, mainly through the use of biological insecticides that remain active for a long period of time in mosquito breeding sites. The objective of this work was to evaluate the larvicidal effect of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) for the control of *Ae. aegypti*. For this test 10 concentrations of *Bti* were analyzed by checking the efficacy of mortality after 48h. Logistic regression analysis of log death (dose (μ l)) and confidence intervals of the Probit model determined the lethal concentrations CL_{50} , CL_{90} as well as the Biopotency (UTI / ml) of the formulated product was determined. Residual effects were also evaluated in dry environments and water environments. In addition, complementary tests were carried out, such as confirmation of the presence of proteins through the evaluation of the molecular weight of the proteins by Electrophoresis. Determination of Colony-Forming Units (CFU) of *Bti* during the period of residual effect. The results demonstrate that the LC_{50} and CL_{90} were 0.3 and 0.7 μ l / L respectively. The power determination analysis used the LC_{50} of 0.013 mg / L of IPS82 as the base. This is the Power of the new formulation of *Bti*. was set at 800 UTI / μ l. Of the 120 analyzes performed for the representation of the larvicidal effect, 72 presented mortality superior to 99% in 48h of exposure. As for the residual effect in environments with water, the new formulation was suitable for use until the 13th day. For dry environments the same was affective until the 30th day of analysis. The molecular weights of the proteins found were compatible with the weights of the proteins Cry10A, Cry11A, Cry4A, Cry4B. During the evaluation of the residual effect in locations with water the concentration of CFU / ml of water was 1.00×10^5 . On the 4th day the concentration was 7.33×10^4 and after the 13th day the concentration had decreased to 3.50×10^3 cells per ml. The new formulation of *Bti* proved to be suitable for commercialization, presents effective results in the control of *Ae. aegypti* remains virulent in both water and dry environments, does not show influence of thermovariation, has remained stable for the equivalent period for three years and does not present plant phytotoxicity.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (71 p.) August, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	XIV
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	<i>Aedes aegypti</i>	4
3.2	<i>Aedes aegypti</i> como Vetor.....	7
3.3	Controle Vetorial	9
3.4	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	12
3.5	Mecanismo de ação das proteínas Cry.....	14
3.6	Fitotoxicidade em plantas <i>Lactuca sativa</i>	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	População de Estudo	17
4.2	Produção do <i>Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)</i>	17
4.3	Verificação de Pureza	18
4.4	Análise de concentração por UFC	19
4.5	Análise de Proteínas por SDS.....	20
4.5.1	Purificação das Proteínas	20
4.5.2	Análise de Proteínas por SDS	20
4.6	Efeito larvicida em <i>Aedes aegypti</i> sob diferentes temperaturas.....	21
4.7	Determinação de Potência (UTI/ml) do novo formulado	23
4.8	Avaliação do efeito residual do formulado de <i>Bti</i> tanto em local com água quanto em locais secos.....	23
5.	RESULTADOS	26
5.1	Verificação de Pureza	26
5.1.1	Caracterização morfológica macroscópica da colônia	26
5.1.2	Análise microscópica de características morfológicas	26
5.2	Análise de Concentração por contagem de UFC.....	27
5.3	Análise de proteínas por SDS Page.....	28
5.4	Efeito do larvicida em <i>Aedes aegypti</i> sob diferentes temperaturas.....	28

5.5	Determinação de Potência (UTI/ml) do novo formulado.....	30
5.6	Avaliação do efeito residual do formulado de <i>Bti</i> tanto em local com água quanto em locais secos.....	31
5.7	Avaliação do Efeito residual do formulado de <i>Bti</i> em local seco	32
5.8	Efeito da Fitotoxicidade do novo formulado sobre <i>Lactuca sativa</i>	32
6.	DISCUSSÃO	36
7.	CONCLUSÃO	45
8.	REFERÊNCIAS	46
9.	ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Referência de diluições do formulado de Bti.....	21
Tabela 2 – Concentração do novo formulado expressa em UFC/ml.....	27
Tabela 3 - Regressão logística de Morte por log (dose (μ l)) e intervalos de confiança através do modelo Probit do programa XLSTAT.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global de <i>Aedes aegypti</i> (A) e <i>Aedes albopictus</i> (B). Os pontos pretos referem-se às populações de mosquitos encontradas.....	9
Figura 2 - Parâmetros utilizados para caracterização de colônias.....	19
Figura 3 - Croqui da disposição das larvas de <i>Aedes aegypti</i> testadas em cada bioensaio.	22
Figura 4 – Colônia de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> em placa de Petri.....	26
Figura 5 - <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	27
Figura 6 - Gel de policrilamida SDS-PAGE 10% mostrando as proteínas de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	28
Figura 7 - Mortalidade larval de <i>Aedes aegypti</i> linhagem Rockefeller após 24 h de exposição a <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> em nova formulação.....	29
Figura 8 - Mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> quando se usou a nova formulação de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> na concentração de CL ₉₀	31
Figura 9 - Efeito residual do formulado de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> quando testado a seco durante 30 dias.....	32
Figura 10 – Porcentagem de germinação obtida no teste de fitotoxicidade em <i>Lactuca sativa</i> tratada com <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	33
Figura 11 –Determinação do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em <i>Lactuca sativa</i> tratada com <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	33
Figura 12 – Média dos tamanhos das radículas das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> tratada com <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	34
Figura 13 – Média dos tamanhos dos Hipocótilos das plântulas de <i>Lactuca sativa</i> tratada com <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	<i>Aedes</i>
B.	<i>Bacillus</i>
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CD	Concentrações diagnóstico
CL	Concentração Letal
CM	Concentrações múltiplas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fc	Fator de Correção
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ICP	Cristais de Proteínas Inseticidas
IVG	índice de velocidade de germinação
L1	Estádio Larval 1
L2	Estádio Larval 2
L3	Estádio Larval 3
L4	Estádio Larval 4
LMC	Larvas mortas no controle
LMT	Larvas mortas no teste
PAGE	Poliacrilamida
PAHO	Pan American Health Organization
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
UFC	Unidade formadora de colônias
UTI	Unidade Internacional de Toxicidade
UR	Umidade Relativa
var.	Soroveriedade
Vip	Vegetative insecticidal proteins
WHO	World Health Organization
WHOPES	(World Health Organization - Pesticide Evaluation Scheme)

2. INTRODUÇÃO

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito que possui comprovada capacidade vetorial para hospedar várias espécies de arbovírus, e competência para transmiti-los a vários animais vertebrados, incluindo humanos. Muitos desses arbovírus podem provocar doenças como: Dengue, Chikungunya, Febre Amarela, e Zika. Sua eficiente competência de transmitir tais agentes de doenças se deve, principalmente, à atividade hematofágica das fêmeas, que podem se alimentar de vários hospedeiros durante seus ciclos gonotróficos, garantindo a transmissão de arbovírus (Aldama & Garcia, 2001; Lozovei, 2001;). *Ae. aegypti* é uma espécie altamente domiciliada, que realiza frequente oviposição em recipientes próximos a água, o que constitui um risco iminente para a proliferação desses mosquitos (Monath, 1994; Clements, 1999). Também se deve ressaltar a dificuldade existente em realizar seu controle populacional, uma vez que possuem um ciclo de vida particular, procriando-se nos mais variados habitats, de preferência próximo a residências humanas (Carrera, 1991).

A comprovada capacidade de resistência desses insetos aos vários inseticidas químicos utilizados nas últimas décadas (Lima et al., 2006) e a maior consciência mundial para a preservação do ambiente natural, conduziram à pesquisa científica a estudos de larvicidas biológicos como o *Bacillus thuringiensis israelensis* – *Bti* (Santos 2008). Este tipo de larvicida causa uma ação patogênica nas larvas de insetos suscetíveis, que é produzida por esporos do complexo cristalino proteico do inseticida no intestino. Os esporos deste complexo são dissociados por proteases resultando na formação de poros na parede celular, o que resultará na morte das larvas através de uma citólise celular (Lima et al., 2005).

Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* são comercializados há mais de 50 anos, com um mercado estimado em mais de 80 milhões de dólares ao ano (WHO, 1998). A utilização do *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) como larvicida é uma das técnicas de bio-controle mais antigas para combater *Ae. aegypti*. Este larvicida é particularmente útil em populações que apresentem altos níveis de resistência aos inseticidas químicos (Rozendaal, 1997). No Brasil foi necessária a troca de um larvicida químico (Temephos) por *Bti*, em áreas em que populações

de *Ae. aegypti* se tornaram resistentes a este produto (Braga & Valle, 2007). Contudo, as formulações de *Bti* existentes disponíveis para utilização em larga escala, apresentam baixa persistência no ambiente, quando comparado ao Temephos (Braga & Valle 2007).

“O uso de *Bti* se mostra muito efetivo no combate a simúldeos e mosquitos, porém possui algumas falhas. Para que o efeito sob o controle dos insetos seja eficaz é necessária a melhoria constante dos produtos no mercado” (Arcy, Silva & Cunha, 2014). Baseado no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar uma nova formulação de um bio-larvicida a base de *Bti*, o qual foi desenvolvido junto à empresa Simbiose-agro, para o controle de larvas de *Ae. aegypti*. Assim, foram feitos bioensaios para avaliar sua eficácia e substituir as formas tradicionais de utilização de produtos no controle deste vetor, uma vez que além de ser menos agressivo ao ambiente não apresenta efeito fitotóxico a plantas modelo como *Lactuca sativa*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar uma nova formulação com *Bacillus thuringiensis israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar a pureza das bactérias no produto bem como a estabilidade do mesmo sob condições ideais de armazenamento.

3.2.2 Buscar a presença de 03 grupos de proteínas Cry10, Cry11 e Cry4 através da avaliação do peso molecular das proteínas em SDS PAGE.

3.2.3 Verificar a susceptibilidade de larvas de terceiro instar final e quarto inicial sob diferentes temperaturas, estimando-se as CL₅₀, CL₉₀.

3.2.4 Determinar o efeito residual deste produto tanto em locais com água quanto em locais secos.

3.2.5 Verificar a fitotoxicidade do produto sobre *Lactuca sativa*.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito altamente domiciliada que realiza frequente oviposição em recipientes com água, estabelecendo criadouros artificiais dentro e ao redor de residências. Assim, água limpa e parada no interior de cisternas, latas, pneus e vasos de plantas constituem um risco iminente para a proliferação do mosquito (Monath, 1994; Clements, 1999). Esta espécie de mosquito caracteriza-se por hábitos preferencialmente diurnos e predileção pelo sangue humano para alimentação, com pico de atividade entre 8 e 10 horas da manhã e 16 e 18 horas da tarde, escondendo-se nos horários mais quentes (Gadelha & Toda, 1985; Silva et al., 2004).

O intervalo entre hematofagia e oviposição corresponde a 72 horas, dependendo de condições ótimas de temperatura e disponibilidade de alimento (PAHO, 1995). Estando completamente amadurecido, o ovo é capaz de suportar condições ambientais adversas, podendo resistir a situações como ressecamento, baixa de temperatura, insolação e mesmo assim permanecer viável até 492 dias após a oviposição (Gomes et al., 2016). O ovo pode permanecer por muitos meses no ambiente, só eclodindo ao entrar em contato com a água (Gomes et al., 2016). Quanto ao ciclo de vida, sob condições favoráveis como temperatura e umidade, o embrião está apto a eclodir por volta de 4 a 7 dias após entrar em contato com a água, etapa esta que precede o período larvário, compreendido entre quatro a oito dias (MS, 2017).

As larvas são exclusivamente aquáticas e os criadouros preferenciais desses insetos são os recipientes artificiais, tanto os deixados abandonados pelo homem a céu aberto, que são preenchidos pelas águas das chuvas (como pneus, garrafas, vasos e pratos de plantas, latas e vasos de cemitérios) quanto aqueles utilizados para armazenar água no uso doméstico (como caixas d'água, tonéis e cisternas destampados). As larvas desses mosquitos também se desenvolvem em ambientes naturais como bromélias, buracos em árvores, escavações de rochas e bambu. Alimentam-se de partículas orgânicas presentes na água, alguns tipos de algas e a filtração é a forma mais comum de alimentação, podendo filtrar

até dois litros de água por dia (Consoli & Oliveira, 1994).

As larvas, morfologicamente são alongadas, vermiformes e esbranquiçadas. O corpo é formado por cabeça, tórax e abdome. A cabeça possui um par de antenas, olhos compostos e alguns ocelos e aparelho bucal mastigador-raspador. O tórax é globoso, mais largo do que a cabeça, com segmentos fundidos e revestidos por cerdas. No oitavo e último segmento localiza-se o sifão respiratório (curto e quitinizado) (Christopher, 1960).

O ciclo larval de *Ae. aegypti* compreende quatro instares, sendo que a mudança entre os instares dura aproximadamente 24 horas, quando em temperatura média de 28,5°C. O primeiro instar (L1) rompe o ovo pelo atrito do espinho de eclosão, formado por quitina situado na cabeça da larva contra a casca do ovo (Christopher, 1960). A durabilidade dessa fase depende de fatores, tais como temperatura da água, densidade populacional no criadouro e disponibilidade de alimento. O quarto instar (L4), estando na sua fase final de desenvolvimento, cessa a alimentação, em virtude da sua metamorfose para o próximo estágio de vida, a pupa, o qual não se alimenta mais. O seu completo desenvolvimento leva em torno de 6 a 10 dias e é influenciado por temperatura, luminosidade, salinidade, poluentes orgânicos e inorgânicos, entre outros (Christopher, 1960).

Após esse período, inicia-se a fase de pupa, a qual tem duração aproximada de 48 horas. A pupa não se alimenta e é o estágio de vida que representa a transição do indivíduo do meio aquático para o terrestre. No estágio de pupa, esta tem aspecto de “vírgula” em virtude de sua cabeça unir-se ao tórax, formando o cefalotórax. Normalmente fica parada na superfície da água para que o mosquito adulto possa emergir de seu interior. Seu corpo tem coloração esbranquiçada semelhantemente à larva, porém, à medida que se aproxima da transformação em adulto, adquire coloração mais escura. Respiram por trompas respiratórias localizadas no cefalotórax que atravessam a superfície da água (Christopher, 1960). Desde a fase de embrião até a forma adulta transcorre uma média de dez dias e o acasalamento é realizado no primeiro ou segundo dia de vida adulta (Consoli & Oliveira 1994; Costa, 2001; Forattini, 2002). Depois de emergir da pupa, leva alguns segundos para que a quitina de seu corpo se enrijeça e permita que este tenha forças para voar e deixar o sítio de oviposição.

Os espécimes adultos medem de 3 a 6 mm de comprimento. Apresentam coloração escura com faixas brancas nas bases dos segmentos no torso e um “desenho em forma de lira” no mesonoto. Apresentam antenas plumosas com palpos mais longos nos machos, e pilosas nas fêmeas, sendo esta uma das características morfológicas mais simples para a diferenciação. As fêmeas adultas são hematófagas, pois necessitam de sangue para maturação dos ovos. Apresentam aparelho bucal picador, embora também se alimentem de seivas de plantas como os machos, enquanto esses possuem aparelho bucal tipo sifonador-sugador (Christopher, 1960, Daffre, 2013).

A fêmea alimenta-se preferencialmente de sangue de humanos. Contudo, sua dieta pode variar entre outros animais vertebrados (Consoli, 1994). Normalmente as fêmeas desta espécie evitam o sol forte e temperaturas elevadas, tendo por hábito preferencial picar nas primeiras horas da manhã e nas últimas horas da tarde, embora não seja incomum encontrar fêmeas fazendo repasto sanguíneo à sombra nas horas mais quentes do dia. As picadas normalmente não coçam e não doem, o que muitas vezes faz com que indivíduo não perceba a picada (Saúde, 2012). Após o repasto, as fêmeas costumam levar até três dias para realizarem a oviposição (Consoli, 1994). Em geral a cada repasto sanguíneo a fêmea faz uma postura de ovos depositando cerca 70 ovos, os quais são liberados aos poucos em diversos criadouros, a fim de aumentar as chances de perpetuação de sua linhagem e a dispersão do mosquito (Bentley, 1989). A capacidade de dispersão do mosquito pelo vôo é pequena quando comparada a outras espécies. A fêmea normalmente reside nas proximidades do local onde eclodiu, deslocando-se no máximo num raio de 100 metros. Contudo, quando a fêmea está grávida ela pode se deslocar por áreas mais longes em busca de um local adequado para a postura dos ovos. Dentre os motivos que podem interferir na seleção do sítio de oviposição das fêmeas os aspectos físicos, químicos e biológicos são os mais determinantes (Carrera, 1991), sendo que os aspectos sensoriais e as respostas visuais são determinantes na escolha dos locais de oviposição (Carrera, 1991).

4.2 *Aedes aegypti* como Vetor

No ano de 1881 o pesquisador Carlos Finlay citou pela primeira vez o mosquito *Aedes aegypti* como vetor, sendo a Febre Amarela, a primeira doença vinculada a esta espécie (Exposito & Finlay, 1971; Bisset, 2002). Em 1906, “as primeiras evidências de que o inseto também era transmissor do vírus da dengue foram publicadas por Bancroft” o que foi passível de confirmação por Agramonte, ainda em 1906 e posteriormente por Simmons, com data de 1931 (Martinez, 1990).

Posteriormente, experimentos comprovaram a eficiência de *Ae. aegypti* para infecção e transmissão de 22 arbovírus distintos, o que faz da sua presença um grande problema para a saúde pública, tornando seu registro um importante acontecimento. Atualmente, centenas de estudos relatam a grande dispersão dessa espécie de mosquito e o seu papel na transmissão de arbovírus relacionados à dengue, chikungunya e zika. No continente americano, mosquitos naturalmente infectados com o vírus da dengue foram encontrados pela primeira vez em 1995, no México. No estudo foram detectados os vírus DENV-1 e DENV-2 em machos adultos, fato que sugere a ocorrência de transmissão trans-ovariana do vírus nessa região (Ibañez-Bernal et al., 1997). Em fêmeas infectadas com o vírus da dengue pode ocorrer a transmissão vertical do vírus, de forma que um número variável de fêmeas da prole, já nasce infectada (Consoli, 1994).

Chikungunya é uma infecção causada por um arbovírus do gênero Alphavirus (Togaviridae). Até meados de 2006 esse vírus havia sido detectado somente na África (onde estava restrito a um ciclo silvestre) na Ásia Oriental e na Índia, onde sua transmissão era principalmente urbana, envolvendo os vetores *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus* (Figueiredo, 2007). No Brasil, casos da doença foram detectados pela primeira vez em agosto de 2010. Em junho de 2014 foram confirmados seis casos no Brasil de soldados que retornaram de uma missão no Haiti (Burt, 2012). Segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde, no dia 15 de outubro de 2014, foram confirmados 337 casos no país, sendo 274 apenas na cidade de Feira de Santana, na Bahia. Em 2015, ocorreu um surto na América do Sul nos primeiros quatro meses deste ano com estimativa de 10 mil casos e 113 mortes (Cao-Lormeau et al., 2014, loos et al., 2014). Estima-se que 2.500 desses

casos foram no Brasil, a maioria dos casos na Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Em 2016 a doença continuou a se espalhar pelo país. No primeiro semestre de 2017 o estado do Ceará viveu uma nova epidemia da doença.

O vírus Zika, ZIKV, foi isolado pela primeira vez de uma espécie de macaco *Rhesus* na floresta Zika de Uganda, em 1947 (Dick et al., 1952). Durante meio século, o vírus foi descrito como causador de infecções esporádicas em humanos na África e na Ásia, até 2007, quando ocorreu uma epidemia de febre de Zika em Yap Island, Micronésia (Duffy et al., 2009). Em 2013, uma grande epidemia foi relatada na Polinésia Francesa, concomitante com uma epidemia de dengue causada pelos sorotipos 1 e 3. ZIKV tem sido considerado emergente desde 2007 (Cao-Lormeau et al., 2014, Iosifidis et al., 2014).

No Brasil, os primeiros casos de Zika Vírus apareceram no início de 2012 (Caron 2012). Pacientes começaram a apresentar sintomas semelhantes aos da gripe, seguido de manchas na pele e artralgia. No início de 2013, pesquisadores da Universidade Federal da Bahia (UFBA) constataram, através de análises de reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) que os sintomas apresentados pelos pacientes eram causados pelo vírus Zika (Faria et al, 2016). Suspeita-se que sua entrada tenha se dado durante a Copa das Confederações de 2013, quando o país recebeu turistas de várias partes do mundo, inclusive de áreas atingidas de forma mais intensa pelo vírus (Faria et al, 2016). Após entrada no país o vírus começou a se espalhar pela América do Sul e posteriormente América Central. Estima-se que em 2015, no Brasil foram registrados mais de 14.827,01 casos de Zika, 13.524 na Colômbia, 5.397 em El Salvador, 4.744 em Cabo Verde, 600 em Honduras, 68 na Guatemala. Demais países da América do Sul / Central somaram aproximadamente 170 casos. (Faria et al, 2016).

Estudos recentes (Kraemer et al, 2015) relatam a atual dispersão de *Ae. aegypti* pelo mundo e identificam sua ampla distribuição em quase todos os continentes. Entretanto, o Brasil parece ser o país de maior importância na dispersão dos mosquitos, uma vez que os mesmos são encontrados de norte a sul do país. (Fig. 1)

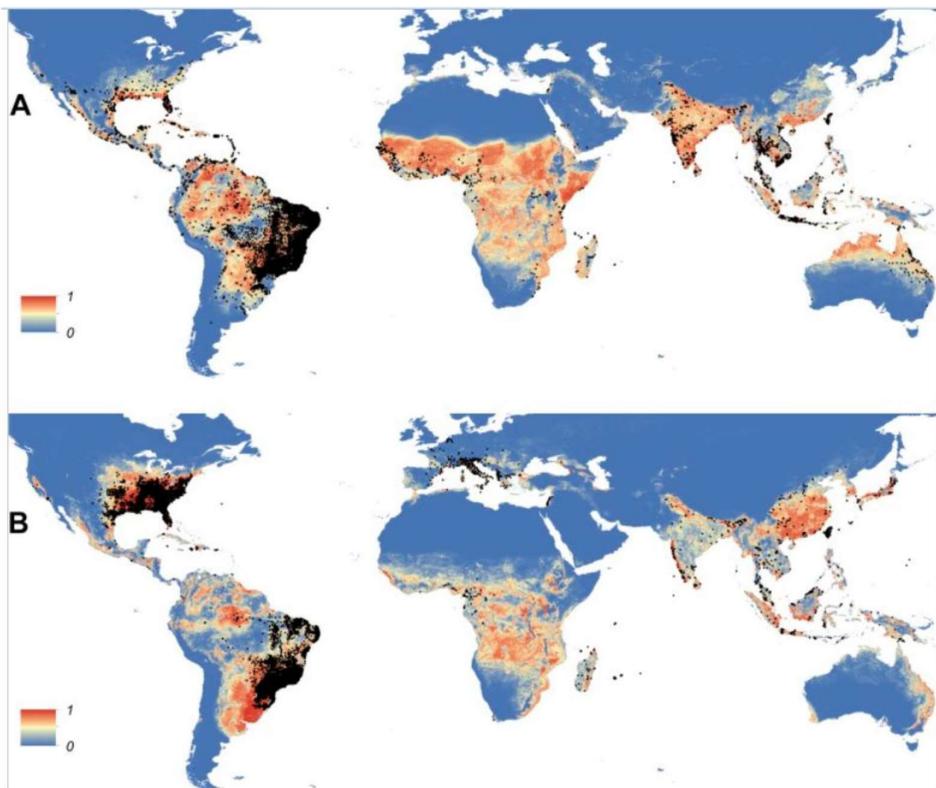


Figura 1 - Distribuição global de *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B). Os pontos pretos referem-se às populações de mosquitos encontradas. Adaptado de Kraemer et al., (2015).

4.3 Controle Vetorial

Existem três métodos específicos destinados para o controle vetorial os quais são baseados em princípios químicos, físicos e biológicos. O controle biológico foi definido como a ação de parasitoides, predadores e patógenos que interferem na manutenção da densidade populacional de outro organismo (Debach, 1968). Dessa forma, envolve a introdução natural ou artificial, no ambiente de seus inimigos naturais, tais como predadores, parasitos ou organismos patogênicos. Nesse método de controle pode-se incluir peixes, insetos, protozoários, bactérias, fungos e até mesmo crustáceos (Rozendaal 1997; Ministérios da Saúde & Fundação Nacional De Saúde, 2001).

Recentemente, observa-se um aumento de pesquisas avaliando o potencial de aplicação de microrganismos entomopatogênicos no controle de vetores (Iturbe-Ormaetxeet Al., 2011, Finkler 2012). Estes estudos têm sido estimula-

dos pelo fato de que tanto alguns agentes patogênicos quanto os microrganismos simbiotes de artrópodes, habitam o mesmo ambiente (o intestino médio). Tendo este conceito formado, levanta-se a hipótese de que a relação simbiótica (entre mosquitos e microrganismos) apresenta importantes implicações tanto no sucesso evolucionário destes culicídeos, incluindo sua distribuição e dispersão, quanto no desenvolvimento, inibição e transmissão de seus patógenos (Cirimotich et al., 2011).

O uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos já foi tema de diversos estudos (Scholte et al., 2007, Finkler 2012). No Brasil, os fungos têm sido utilizados basicamente em ensaios controlados de laboratório, apresentando, no entanto, respostas promissoras, em particular a espécie *Metarhizium anisopliae* (Paula et al., 2008, Pereira et al., 2009). Diversas espécies de fungos já foram utilizadas como agente biológico para o controle de várias espécies de mosquitos, seja em condições de laboratório ou em ensaios controlados em campo (Scholte et al., 2004). Para *Ae. aegypti* resultados promissores foram alcançados quando larvas de primeiro e segundo estádios foram expostas aos fungos *Leptolegnia chapmanii* (McCinnis E Zattau 1982) *Lagenidium giganteum* (McCray et al., 1973).

De acordo com Lardeux et al., (2002) o uso de crustáceos no controle de *Ae. aegypti* é conhecido e praticado desde os anos 1980 em países do sudeste asiático, principalmente Vietnã e Tailândia. Peixes são adicionados geralmente em grandes depósitos artificiais, como caixas d'água, tonéis e cisternas, sendo utilizados como alternativas de controle biológico em países como Nicarágua, México e no Sudeste Asiático (Martinez-Ibarra et al., 2003). O controle biológico com agentes, incluindo peixes e copépodes larvófagos apresentaram um papel comprovado no controle de *Ae. aegypti* (Nam et al., 2000; Kay et al., 2002). Entretanto, as dificuldades operacionais (particularmente a falta de instalações, na criação em massa e a necessidade frequente de reintrodução destes agentes) tem reduzido largamente sua utilização (Guzman et al., 2010). Por volta dos anos 1970, foram descobertas bactérias efetivas contra insetos de importância médica, principalmente mosquitos. Em 1964, foi descrita uma cepa de *Bacillus sphaericus* (Bs) com efetividade contra mosquitos (Kellen & Meyers, 1964). Embora seu es-

pectro de ação seja restrito a certos tipos de larvas de mosquito, sua eficácia em águas poluídas tornou-a particularmente útil contra algumas espécies de *Culex*, vetores de filaríoses e de encefalites viróticas. Durante a última década, tem aumentado o uso de Bs em programas de controle de mosquitos que se desenvolvem em águas poluídas, em áreas urbanas (WHO, 1999). Duas outras espécies de bactérias foram descritas como promissoras para o controle de *Ae. aegypti*. Silva et al., (2013) descreveram a toxicidade de *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) contra larvas de *Ae. aegypti*, quando colônias bacterianas foram ofertadas às larvas. Além disso, Silva et al., (2017) determinaram a susceptibilidade larval pela exposição a suspensões bacterianas de *P. luminescens* ou *X. nematophila*, em um gradiente de concentração do sobrenadante de cultivo das mesmas. A suspensão bacteriana de *P. luminescens* foi a mais eficiente para causar mortalidade às larvas. No entanto, o sobrenadante de *X. nematophila* mostrou-se o mais efetivo e mais estável. Os autores observaram também que quando as larvas eram expostas a uma dose subletal de sobrenadante de *X. nematophila*, apresentavam menor taxa de emergência de pupa e um atraso na emergência das mesmas. Conseqüentemente, houve menor taxa de eclosão do mosquito adulto.

De outro modo, outros autores relataram outros grupos de bactérias estão sendo utilizadas para o controle de *Ae. aegypti*, como é o caso de *Wolbachia*, uma espécie de bactéria simbiote intracelular, inofensiva ao homem e a animais domésticos, encontrada naturalmente em mais de 60% dos insetos. A *Wolbachia* é capaz de reduzir pela metade o tempo de vida de um mosquito adulto e é capaz de produzir incompatibilidade citoplasmática completa, o que resulta em uma progênie estéril (Mcmeniman et al., 2009; Moreira et al., 2009; Walker et al., 2011; Dutra et al., 2015).

Dentre todas as bactérias estudadas para esta finalidade, as mais conhecidas são os *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), que vem sendo estudadas desde os anos 70. Após comprovação de sua eficiência, novas cepas e novas formulações, bem como formas de aplicações tem sido cada vez mais estudadas visando a introdução desta bactéria no cenário mundial para o controle vetorial, como vem ocorrendo nos Estados Unidos e África Ocidental. (Donalísio & Glas-

ser, 2002).

4.4 *Bacillus thuringiensis israelensis*

Atualmente a bactéria mais utilizada para o controle de *Ae. aegypti* corresponde a *Bti*, que provoca a morte dos imaturos após sua ingestão (Rozendaal, 1997).

No Brasil, são poucos os trabalhos relacionados ao controle com utilização de *Bti*. O Estado do Rio Grande do Sul foi o primeiro a trabalhar com este biolarvicida (Ruas neto et al., 1984; Ruas neto et al., 1985; Souza et al., 1994; Silveira). Em São Paulo também há alguns trabalhos descritos (Araújo-Coutinho & Lacey 1990; Andrade & Castello Branco 1991). No Paraná, são descritos trabalho de Lozovei et al., (1992) e Cunha & Bassi (1997). Essa bactéria é particularmente útil em populações que apresentem resistência aos inseticidas químicos (Rozendaal, 1997). No Brasil houve a troca de um larvicida químico (Temephos) por *Bti* em áreas consideradas críticas (Braga & Valle 2007). Contudo, as formulações existentes de *Bti*, disponíveis para utilização em larga escala, apresentam menor persistência no ambiente, quando comparado ao Temephos (Braga e Valle, 2007). Enquanto *Bti* pode ser eficaz na redução do número de imaturos em recipientes tratados em curto prazo, as evidências de que a morbidade por dengue possa ser reduzida somente com o uso de *Bti*, é limitada (Boyce et al., 2013). Atualmente, não há evidências suficientes para recomendar o uso de *Bti* como único agente para controle de vetores em longo prazo. São necessários mais estudos que avaliem o efeito da combinação dessa bactéria com outras estratégias de controle vetorial (Boyce et al., 2013). *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram-positiva que forma inclusões protéicas características adjacentes a endospora. Essa bactéria é praticamente indistinguível de *Bacillus cereus* (*Bc*). No entanto, *Bt* tem a capacidade de produzir inclusões cristalinas parasporais, que são tóxicas para certos invertebrados, como espécies de larvas de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera. As inclusões parasporais são formadas por diferentes cristais de proteínas inseticidas (ICP). As ICPs eram chamadas de delta-endotoxinas. Contudo, o termo endotoxina refere-se habitualmente a toxinas associadas com as membranas exteriores

das bactérias Gram-negativas, compreendendo um núcleo lipopolissacarídeo, lípido A e somático (O), sendo assim, este termo não é mais utilizado (Chagas, 2012).

A existência de inclusões parasporais no *Bt* foi observada pela primeira vez em 1915, mas a composição de suas proteínas não foi delineada até a década de 1950. (Schnepf & Whiteley, 1981). Uma das propriedades da maioria das suas inclusões parasporais é a estrutura fina cristalina. No entanto, as subespécies *Bt* podem sintetizar mais de uma inclusão, que pode conter ICP diferentes. Durante o crescimento vegetativo, várias estirpes de *Bt* produzem uma variedade de antibióticos, enzimas, metabolitos e toxinas, incluindo as α -exotoxinas, β -exotoxinas, Toxinas Vip (do inglês vegetative insecticidal proteins) e δ -endotoxinas, que podem ter efeitos sobre os organismos-alvo e os organismos não visados. A β -exotoxina, um “heats table nucleotide” é produzido por algumas subespécies *Bt* durante o crescimento vegetativo e podem contaminar os produtos. A β -exotoxina é tóxica para quase todas as formas de vida, incluindo seres humanos e as ordens de insetos alvo (Schnepf, 1998).

As preparações de *Bti* são amplamente utilizadas contra várias espécies de insetos, principalmente aqueles vetores de agentes de doenças como os mosquitos, devido a sua possibilidade de utilização em água. É aprovado no WHOPES (World Health Organization - Pesticide Evaluation Scheme) para uso no controle de vetores e pode ser usado em água potável que receberá pouco ou nenhum tratamento adicional (WHO, 1981).

4.4.1 Proteínas Cry

O *Bti* produz, a partir do estágio II da esporulação, durante a fase estacionária, corpos de inclusões proteicos compostos pelas δ -endotoxinas. Estas acumulam-se no compartimento da célula-mãe e no final da esporulação, são liberadas juntamente com o esporo (Schnepf et al., 1998). As δ -endotoxinas são compostas por dois tipos de proteínas, Cry e Cyt. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry e/ou Cyt. A massa molecular das toxinas Cry está compreendida entre 30 e 140 kDa (Serafini et al., 2002). A forma do cristal é

determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida (Habib & Andrade, 1998). A habilidade de cristalização das protoxinas pode diminuir sua suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro (Schnepf et al., 1998). Interações complexas como hidrofobicidade, pontes de hidrogênio e, principalmente, pontes dissulfeto, mantem as proteínas associadas e estáveis na inclusão parasporal (Gill et al., 1992). As longas protoxinas Cry, com massa molecular de 130 kDa, são divididas em duas regiões estruturais distintas: a região n-terminal, contendo a toxina ativa, e carboxy-terminal (C-terminal), cuja função ainda não está totalmente elucidada (Höfte & Whiteley, 1989). Alguns estudos demonstram que a porção C-terminal é necessária para a formação do cristal dentro da bactéria (Park et al., 2000; de Maagd et al., 2003; Samir et al., 2006). As toxinas Cry e Cyt pertencem a um grupo de toxinas formadoras de poros (TFP). Proteínas Cry são especificamente tóxicas para insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera. Em contraste, as proteínas Cyt são produzidas por estirpes de *Bt* tóxicas para Dípteros (Bravo et al., 2007).

4.5 Mecanismo de ação das proteínas Cry

O mecanismo de ação das proteínas de *B. thuringiensis* envolve vários passos: ingestão do esporo, solubilização do cristal, processamento das toxinas, união ao receptor, inserção da membrana, agregação, formação do poro e citólise. Para que as proteínas sejam efetivas, primeiramente é necessário que as larvas dos insetos ingiram os esporos e cristais de *B. thuringiensis*. Os cristais produzidos por *B. thuringiensis* ao serem ingeridos são solubilizados no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas chamadas de δ -endotoxinas. As larvas dos insetos-alvo apresentam um intestino médio com um pH muito elevado, 8,5-10 que em contato com o cristal protéico (pH Ácido) promove a dissolução da maioria das protoxinas de *B. thuringiensis*, provocando lesões no epitélio intestinal das larvas (Knowles, 1994).

Para ocorrer a ativação das toxinas, as mesmas precisam ser processadas pelas proteases intestinais (Tripsinas) para liberar polipeptídios tóxicos (Monnerat E Bravo, 2000; Rabinovitch et al., 2000; Bravo et al., 2004).

Após serem ativadas, as toxinas ligam-se a receptores específicos localizados nas membranas das células intestinais (Höfte E Whiteley, 1989; Ravoahangimalala et al., 1993). Esta ligação determina a especificidade das α -endotoxinas e é composta por duas etapas, uma reversível e outra não (Hoffman et al., 1988; Van Rie et al., 1989). A primeira etapa envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Monnerat & Bravo, 2000). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana estão mais ligadas com a toxicidade (Van Rie et al., 1989; Monnerat & Bravo, 2000).

Após ligação a receptores específicos, a toxina rapidamente se une na membrana plasmática das células epiteliais, posteriormente ocorre a formação de poros, advindo assim um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando a morte das larvas (Van Rie et al., 1989; Ihara et al., 1993; Liang et al., 1995; Rabinovitch et al., 2000). Após a morte, a larva apresenta a cor negra, característica das infecções provocadas por infecções bacterianas (Habib & Andrade, 1998; Soberón & Bravo, 2002) o que indica que a os esporos ingeridos pela larva acabam saindo do estado vegetativo e voltam a se reproduzir.

O *Bti* também pode ser utilizado no controle de outras espécies de mosquitos (Glare & O' Callaghan 1998). Os autores isolaram em Israel uma nova subespécie de *Bt* a partir de amostras de solo. Mais tarde, a subespécie foi identificada e denominada *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)*, sorotipo H-14 (de Barjac, 1978). Este sorotipo tem sido considerado específico no combate a espécies de Culicidae, Simuliidae, Chironomidae e TipulidAe.

Muitos progressos têm sido feitos na área de produção de bioinseticidas. Contudo, antes que esses produtos cheguem ao mercado, todas as suas propriedades devem ser determinadas. Um dos fatores importantes a ser levado em consideração é o teste de prateleira, no qual são observadas as reações ocasionadas por fatores abióticos sobre as características do produto após tempos de exposição pré-determinados, obtendo-se assim, a melhor forma de armazenamento e o tempo de validade. Para garantir a segurança na aplicação dos novos produtos é necessário conhecer seus efeitos ao longo dos períodos de teste, tanto para o inseto alvo, determinando as concentrações letais (CL₅₀) e (CL₉₀), bem

como avaliar a sua fitotoxicidade (Arcy, Silva & Cunha, 2014).

4.6 Fitotoxicidade em plantas *Lactuca sativa*

A ecotoxicologia, ciência que estuda os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, surgiu da necessidade de monitoramento das influências das ações do homem sobre a Terra, ações antrópicas e representam uma alternativa para complementar as análises químicas (Wilke et al., 2008). Nos estudos de toxicidades organismos são expostos a várias concentrações de efluentes ou de substâncias potencialmente tóxicas a serem testadas, por um período determinado (Soares, 1991). Os testes de toxicidade são desenvolvidos com o propósito de dimensionar ou prever a toxicidade relativa das substâncias ao meio ambiente (Barosa et al., 2013).

Como uma ferramenta na ecotoxicologia, os bioensaios de fitotoxicidade consistem em fornecer informações relevantes e fiáveis sobre os efeitos de produtos químicos e biológicos sobre as plantas “Superiores”. Os mesmos são baseados na resposta de um estímulo a um organismo vivo ou até mesmo, a exposição a uma determinada toxina (Hader & Richter, 2009). Os bioensaios em que são utilizadas plantas superiores são considerados efetivos para a determinação e monitoramento da toxicidade e têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade de águas e sedimentos contaminados (Fernandes et al., 2007). A ampla variedade de parâmetros de toxicidade, como a taxa de germinação, ganho de biomassa, alongamento de raízes e aspectos bioquímicos é uma de suas principais vantagens, além de possuírem baixo custo (Zaltauskaitė & Cypaitė, 2008). A alface *Lactuca sativa* está entre os organismos-modelo mais utilizados para avaliar a fitotoxicidade e a citogenotoxicidade (Zaltauskaitė & Cypaitė, 2008; Andrade et al., 2010) sendo esta espécie recomendada por agências internacionais para tal finalidade.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 População de Estudo

Foram analisadas larvas de mosquitos *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller provenientes do Laboratório de Entomologia Médica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esta colônia vem sendo mantida no laboratório por vários anos. Concomitantemente foi estabelecida uma colônia da mesma espécie no Laboratório de Entomologia da empresa Simbiose-Agro em Cruz Alta – RS, a qual obedece aos mesmos critérios para criação do laboratório da UFRGS.

Os ovos de *Ae. aegypti* foram colocados em bandejas de plástico com $\frac{3}{4}$ de água e colocados em estufa BOD à $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, $80\% \pm 10$ de UR e foto período de 12h. Até chegarem ao estágio de pupa, as larvas foram alimentadas com ração para gatos Purina® CatChow® triturada e esterilizada. As pupas foram colocadas em gaiolas (30cm x 60cm x 30cm) individualizadas e identificadas para implantação de colônia. No interior das gaiolas os adultos foram tratados com uma solução de glicose (10%), que foi renovada duas vezes por semana. Para o desenvolvimento de seus ovos, as fêmeas realizaram a hematofagia duas vezes por semana em um protótipo no qual é possível utilizar sangue comercial de Carneiro (Utilizado em Agar Sangue) para o fornecimento dos micronutrientes necessários ao desenvolvimento de seus ovos. Recipientes de plástico preto, com papel filtro umedecido foram colocados no interior de cada gaiola, como local de oviposição das fêmeas.

5.2 Produção do *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*)

A produção de *Bti*, por se tratar de um processo fermentativo delicado, deve se enquadrar dentro de todas as boas práticas de fabricação, controle de qualidade e garantia de qualidade, empregadas pela Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP).

Para a realização do processo fermentativo, foi utilizado uma cepa de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), CEPA – LFB-FIOCRUZ 584. Os biorreatores e a cepa foram disponibilizados pela empresa Simbiose-agro de Cruz Alta. O pro-

cesso de fermentação foi realizado por batelada descontínuo. O meio de cultura utilizado é um meio não convencional (criado pela empresa), que possui como fonte de carbono e nitrogênio, glicose e extrato de levedura respectivamente, em uma proporção de 100:1. O biorreator utilizado foi de 15 mil litros e possui controle de temperatura (30± 2C), agitação (250 rpm) e aeração constante (200m³/h).

Após o período de fermentação de 36h, o mosto foi filtrado e formulado. (Produto Patenteado e cadastrado no Ministério da Saúde sob registro 3.6384.0002.001.9.) A concentração final do produto foi estabelecida através de análises de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e em Unidades Tóxicas Internacionais (UTI/mg.).

5.3 Verificação de Pureza

Para a realização dos bioensaios, utilizou-se o inseticida novo, formulado com ingrediente ativo *Bti*, lote 001-16-2000, desenvolvido junto a empresa Simbiose-Agro, Cruz Alta - RS.

As colônias bacterianas consistem em milhões de células individuais que interagem umas com as outras de maneiras complexas (Shapiro, 1992; Wimpenny, 1992; Shimada et al., 1995; Ben-Jacob et al., 1998). É importante compreender o mecanismo da formação de colônias e a morfologia resultante, pois é uma chave para entender organizações e interações entre células bacterianas dentro de uma colônia. A morfologia das colônias é altamente influenciada pela forma de células individuais, componentes da parede celular (peptidoglicano, ácido teicoico, lipopolissacarídeo), componentes extracelulares e apêndices (flagela, fimbriae, curli) e resposta celular às pistas ambientais, incluindo disponibilidade de nutrientes, oxigênio e outros gases, sal, acidez, alcalinidade, temperatura, etc. (Nagai et al., 1971; Granek e Magwene, 2010). Portanto, cuidados devem ser tomados antes de descrever os parâmetros. Uma boa determinação da morfologia das colônias depende de uma boa semeadura, pois necessita-se que as colônias sejam bem separadas. Basicamente, as colônias são classificadas e descritas através de três critérios: forma, elevação e margem (Fig. 2). (Biomedicina Padrão, 2013.)

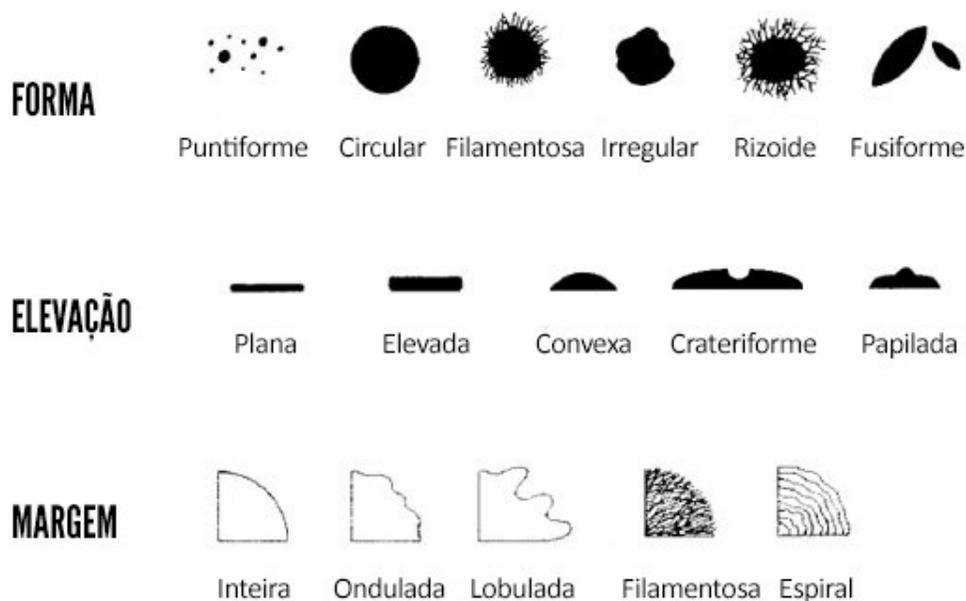


Figura 2 - Parâmetros utilizados para caracterização de colônias.

Assim, como forma de determinação de pureza da cepa utilizada, foi realizada a caracterização morfológica da colônia, bem como a análise microscópica das características morfológicas das células e esporos durante todo o processo de fermentação e filtração.

5.4 Análise de concentração por UFC

Para a determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), utilizamos como referência (EMBRAPA, 2012). Este método é quantitativo, onde o resultado é expresso por UFC/ml. A amostra deverá ser homogeneizada com o diluente esterilizado (água – Salina 8,5%) e tratada termicamente a $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 minutos. A partir disso, diluições decimais são preparadas até a diluição $1,0 \times 10^{-8}$, posteriormente foram espalhadas na superfície do meio de cultura e incubadas a $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante um período de 48h (EMBRAPA, 2012).

Para a avaliação da estabilidade do produto, uma amostra do formulaço de *Bti* foi submetida a stress térmico em estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 dias a fim de avaliar as características físicas do produto. A contagem dos dias foi iniciada após a temperatura do produto ficar parecida com a da estufa (aproximadamente 48h). Para fazer a avaliação da estabilidade das bactérias foram realizadas contagens

de UFC e medição PH durante 22 meses. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistic 6.0.

5.5 Análise de Proteínas por SDS

5.5.1 Purificação das Proteínas

A extração de proteínas foi realizada segundo o protocolo descrito por Lecadet et al., (1991), com algumas modificações. As estirpes foram crescidas em meio Agar nutriente (Líquido), incubados por 72h sob agitação de 200 rpm e temperatura de 28°C +-2. Em seguida foram preparadas cinco amostras contendo 50 ml. Cada amostra recebeu uma dosagem correspondente às diluições de 20 µl/L, 10 µl/L, 5 µl/L, 2,5 µl/L e 1,25 µl/L. Posteriormente, as cinco amostras foram armazenadas em temperatura 28°C +-2 para análise overnight. Em seguida 4,5 ml das amostras 1, 2, 3, 4 e 5 foram centrifugados em micro-centrifuga a 14.000 rpm por 20 min. O Sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado em 1,5 ml de NaCl 5M duas vezes e posteriormente foi ressuscitado em 1,5 ml da solução de inibidores de proteases (1 mM de PMSF + 100 mM de EDTA) e centrifugados em velocidade máxima 14000 rpm por 30 minutos. Para finalizar, o sedimento foi ressuscitado em 200µl da solução PMSF 1 mM e EDTA 100mM.

5.5.2 Análise de Proteínas por SDS

A análise da produção da proteína de interesse foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, de acordo com Laemmli (1970). A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando-se mini-gel (60 x 80 x 1,0 mm) pelo sistema de corrida Mini PROTEAn (Bio-Rad). O gel de separação foi preparado na concentração de 10% de poliacrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 30: 0,8%) e 1% de SDS e de 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 0,5% SDS. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 30 mA e 300V por 90 min em temperatura ambiente. Para amostras de 20 ml, foram adicionados 10 ml de tampão de amostra Laemmli 4X [Tris-HCl 0,125 M (pH 6.8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,01% (m/v)]. A mistura foi aque-

cida por dois minutos a 100°C e aplicada em dois géis igualmente. Após o período de corrida das amostras em gel, as bandas polipeptídicas foram coradas nos géis pela coloração com Coomassie-Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) dissolvido em solução fixadora [metanol 50% (v/v) e Ácido Acético 10% (v/v)], deixados em baixa agitação por até 20 min. O gel foi descorado por solução descorante [metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)] sob baixa agitação por 1 h. Os géis foram conservados em água destilada até serem analisados e fotodocumentados.

5.6 Efeito larvicida em *Aedes aegypti* sob diferentes temperaturas.

Foram avaliadas dez diluições diferentes (Tab. 1) em um total de 132 análises.

Tabela 1 - Referência de diluições do formulado de *Bti*.

Diluição	Diluição µl/L
A	20,00
B	10,00
C	5,00
D	2,50
E	1,25
F	0,63
G	0,31
H	0,16
I	0,08
J	0,04

Os bioensaios seguiram o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde, descrito pela WHO em 1981, Lima et al., (2003) e Braga et al., (2004) utilizando resposta à exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM) para estabelecimento da linha-base de dose resposta. Atualmente, a atividade larvicida é expressa em termos de doses letais (LD₅₀) ou concentrações letais (por exemplo CL₅₀, CL₉₀) de acordo com o método utilizado

5.7 Determinação de Potência (UTI/ml) do novo formulado

Para a padronização e determinação da potência dos produtos são utilizados como referência os valores da concentração letal 50 (CL₅₀), sendo que a potência deve ser expressa em Unidade Tóxica Internacional por mililitro (UTI/ml) e a mesma é obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Potência da Amostra (UTI/ml)} = \frac{\text{CL}_{50} \text{ Padrão} \times \text{Potência Padrão}}{\text{CL}_{50} \text{ Amostra testada}}$$

Esta fórmula deve ser utilizada para determinação da potência tanto em produtos químicos como em amostras biológicas, sendo que para a determinação da potência em produtos à base de *Bti* o produto padrão utilizado é o IPS-82 (isolado 1884), cuja potência contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti* foi previamente determinada em 15.000 UTI/ml do produto (de Barjac; Larget E Thiery, 1984), sendo que a CL₅₀ padrão utilizada foi de 0,013 mg/L de IPS-82.

5.8 Avaliação do efeito residual do formulado de *Bti* tanto em local com água quanto em locais secos.

A finalidade do teste de efeito residual em locais com água é simular a persistência das proteínas do *Bti* no ambiente, após a aplicação do produto nos locais com água parada. Para verificar o efeito residual foi utilizada a concentração correspondente a CL₉₀ do produto, previamente calculada para a temperatura de 30°C. Para avaliar o efeito residual utilizam-se larvas de terceiro instar tardio e/ou quarto instar inicial da cepa Rockefeller.

Nestes bioensaios também foram utilizadas quatro réplicas, cada uma contendo 500 ml da solução em recipientes plásticos com capacidade de 1.000 ml. Cem larvas foram colocadas em cada réplica, totalizando 400 larvas. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados à temperatura de 25 °C com umidade relativa de 80% (±10%), em câmara climatizada. A mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição aos produtos. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981). As larvas sobreviventes aos testes foram descartadas. Em seguida, a so-

lução de cada réplica foi filtrada e 100 novas larvas sadias foram colocadas para exposição. Este processo foi repetido até que a mortalidade fosse inferior a 50%. O mesmo procedimento foi realizado com os grupos controle.

Para a descrição correta da determinação da porcentagem de larvas mortas foi utilizada a seguinte fórmula (WHO, 1981.)

$$\frac{\% \text{ Larvas mortas nas Diluições} - \% \text{ Larvas mortas no Controle}}{100 - \% \text{ Larvas mortas do Controle}} \times 100$$

Acredita-se que a principal causa para o decréscimo do índice de mortalidade após o terceiro dia de experimento seja a diminuição do número de esporos presentes na água. Assim, para comprovar essa hipótese, foi realizado um experimento onde repetimos o teste de avaliação do efeito residual. Contudo, após a retirada diária das larvas, uma alíquota de água era coletada para realizarmos a contagem bacteriana por UFC e determinarmos a relação de esporos/larvas. Para a contagem das UFC utilizamos o meio seletivo com penicilina G (100 mg/L) (Jung et al., 1998).

Para a avaliação do efeito residual do formulado de *Bti* em local seco, foram dispostos 120 copos plásticos com tampa, devidamente identificados conforme a seguinte fórmula (Dia de análise – Repetição). Foi utilizada uma concentração equivalente a CL₉₀ do formulado de *Bti* e posteriormente os copos foram fechados e colocados no exterior, sob temperatura ambiente e exposição solar. Após um período de 24h de exposição, os copos 01-01; 01-02; 01-03; 01-04; foram retirados para a avaliação de mortalidade e efeito residual. Foram adicionados 100 ml de água filtrada e 25 larvas em cada uma das três repetições, e após 48h foi feita a contabilidade de larvas mortas. No segundo dia após o início do experimento foram retirados os copos 02-01; 02-02; 02-03 e 02-04. Os testes seguiram no mesmo padrão até o final do experimento onde obtivemos 30 dias de análises, com quatro repetições por dia. Como controle, diariamente eram selecionadas 25 larvas sadias de terceiro instar e colocadas em 100 ml de água filtrada. Os dados de temperatura, umidade relativa do ar (UR), insolação total diária e chuva acumulada do período de estudo, disponibilizados pelo Instituto Nacional

de Meteorologia (Anexo I) foram utilizados como referência para a determinação de variação aos fatores abióticos.

5.9 Fitotoxicidade do produto sobre *Lactuca sativa*.

Para a realização do teste de fitotoxicidade em que seguiu o protocolo de (Fujiwara, 2017) foram selecionadas cinco concentrações do formulado de *Bti* (A- 0,068 μ L/L, B- 0,68 μ L/L, C- 1,57 μ L/L, D- 157 μ L/L e E- 1,57ml/L), sendo estas concentrações 10% da CL₉₀, Concentração diagnóstica (CD), 100xCD e 1000xCD, respectivamente. Para o grupo controle foi utilizado somente água. Em 05 placas de Petry foram dispostas 10 sementes de *Lactuca sativa* sob papel Germitex. Após, foram adicionados 5 ml de cada uma das concentrações do formulado de *Bti*. Posteriormente as placas foram fechadas com plástico filme, a fim de evitar perda de umidade. As placas foram colocadas em estufas BOD a 25°C e fotoperíodo 12/12h. Diariamente, durante sete dias, foi contabilizada a quantidade de sementes germinadas em cada uma das placas. Após a contagem do sétimo dia, em cada uma das plântulas foram feitas as seguintes medições: Tamanho da Radícula (TR) e Tamanho do Hipocótilo (TH). Foram realizadas três repetições com quatro réplicas cada e um grupo controle por concentração, sendo que cada uma das réplicas foi realizada em dias diferentes.

Posteriormente, foram calculadas as porcentagens de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962) que é dado pela seguinte fórmula $IVG = (G1 - G0)/n1 + (G2 - G1)/n2 + \dots + (Gn - Gn-1)/nn$ onde G0 é a contagem no primeiro dia, G1 no segundo dia, ..., Gn no enésimo dia, n1 é o primeiro dia após semeadura, n2 o segundo dia, ..., nn o enésimo dia. Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para teste de normalidade, sendo que as médias dos tratamentos foram comparadas por Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Statistic 6.0.

6. RESULTADOS

6.1 Verificação de Pureza

6.1.1 Caracterização morfológica macroscópica da colônia

As colônias apresentaram tamanho médio (2 a 7 mm de diâmetro), foscas, levemente aveludadas, com forma irregular, margem lobulada e elevação baixa (Fig. 4).



Figura 4– Colônia de *Bacillus thuringiensis israelensis* em placa de Petri. Autor: Ademir Schmitt

6.1.2 Análise microscópica de características morfológicas

As células vegetativas de *Bti* apresentaram formato de bastonete, Gram-positivo. O tamanho das células variaram entre 1,0 e 1,2 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento. As células apresentaram pouca movimentação. Quando analisado em contraste de fase as células apresentaram brilho intenso. Os esporos possuem formato elipsoidal e localiza-se na região central ou paracentral quando no interior da célula-mãe, quando separados da célula mãe continuam apresentando brilho intenso (Fig. 5 a e b).

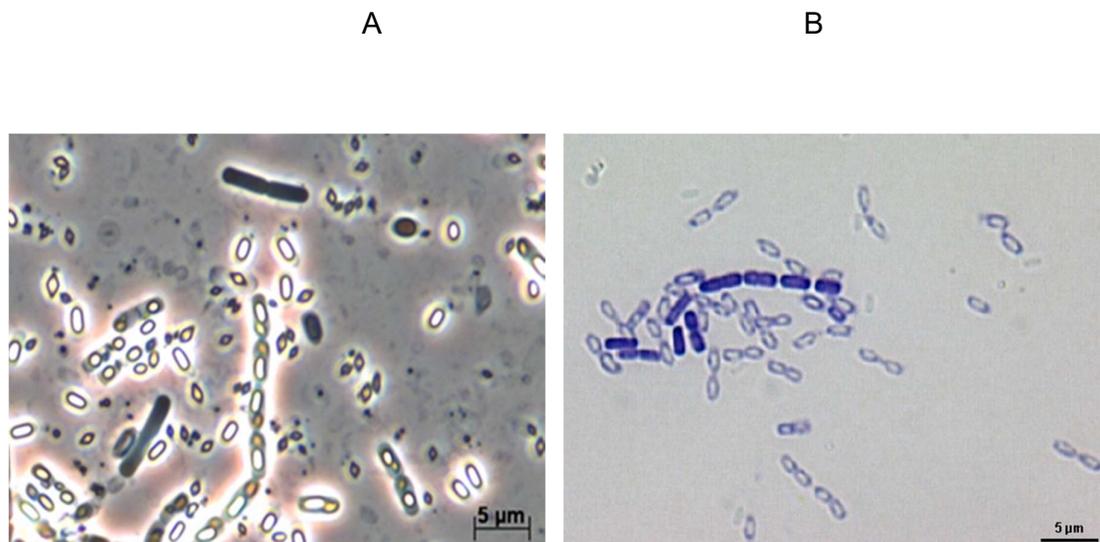


Figura 5- *Bacillus thuringiensis israelensis*: A) Células Vegetativas em Contraste de Fase; B) Células Vegetativas sob coloração de Gram. Autor: Ademir Schmitt. Aumento de 400x.

6.2 Análise de Concentração por contagem de UFC.

Para a determinação da concentração inicial foram realizadas nove análises, sendo estas coletadas de três lotes diferentes do larvicida. As análises foram submetidas aos testes em triplicata. Os dados encontram-se na Tabela 02 sendo que os resultados estão expressos em unidades formadoras de colônia/ml (UFC/ml) de produto.

Tabela 2 – Concentração do novo formulado expressa em UFC/ml.

Amostras	Resultados		
	01	$1,52 \times 10^{10}$	$1,48 \times 10^{10}$
02	$1,41 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^{10}$	$1,68 \times 10^{10}$
03	$1,33 \times 10^{10}$	$1,37 \times 10^{10}$	$1,44 \times 10^{10}$
	1ª Repetição	2ª Repetição	3ª Repetição

6.3 Análise de proteínas por SDS Page

Após a leitura do gel, foi possível constatar a presença de cinco proteínas, sendo três (60, 62, 120 KDa) com pesos moleculares compatíveis com os grupos das proteínas Cry procuradas Cry10, Cry11, Cry4 respectivamente (Fig. 6). A proteína com peso molecular de 73 KDa refere-se a proteínas do grupo Cry3 que variam sua massa molecular entre 73 e 75 KDa (Krieget al, 1983). A proteína com peso molecular de 122 KDa pertence ao grupo das proteínas Cry4, que apresentam peso molecular variando entre 106 e 124 KDa (Krieget al, 1983).

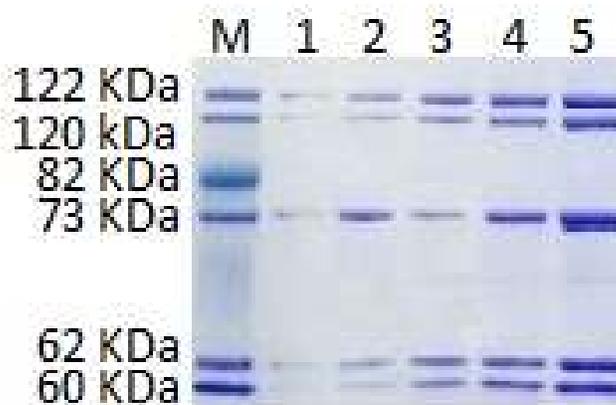


Figura 6 - Gel de policrilamida SDS-PAGE 10% mostrando as proteínas de *Bacillus thuringiensis israelensis* (1-5). M: marcador.

6.4 Efeito do larvicida em *Aedes aegypti* sob diferentes temperaturas

Os resultados indicam que as diluições [A (20,0 µl/L), B (10,0 µl/L), C (5,00 µl/L), D (2,50 µl/L), E (1,25 µl/L), F (0,63 µl/L), G (0.31 µl/L), H (0.16 µl/L), I (0.08 µl/L) e J (0.04 µl/L)] foram tóxicas para as larvas, com mortalidade superior a 90%. A diluição “G” apresentou uma mortalidade aproximada de 50%, e as demais diluições, “H”, “I” e “J” tiveram resultados inferiores a 30% de mortalidade (Fig. 7).

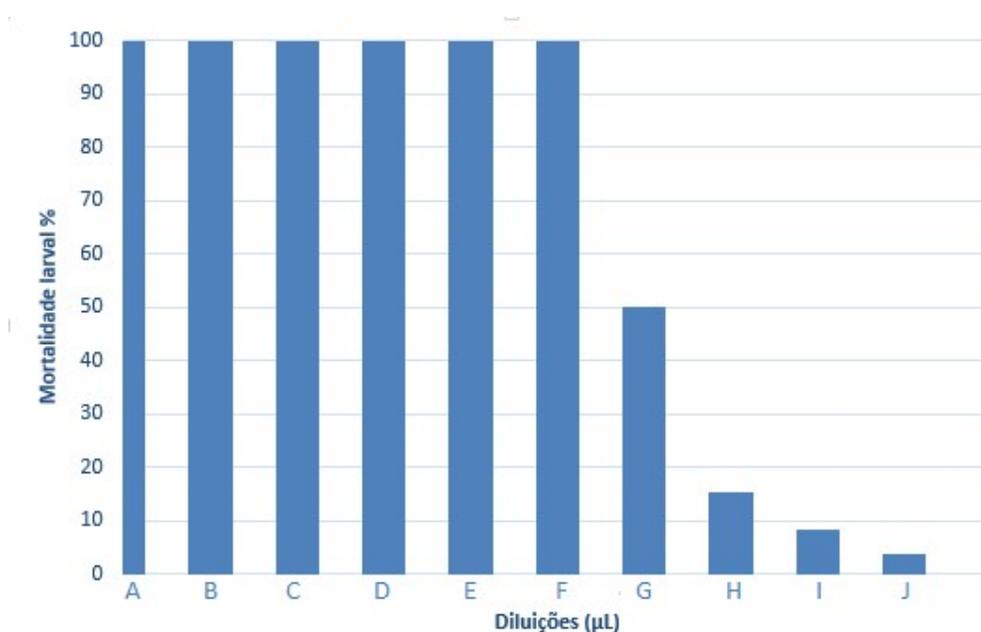


Figura 7 - Mortalidade larval de *Aedes aegypti* linhagem Rockfeller após 24 h de exposição a *Bacillus thuringiensis israelensis* em nova formulação. Cada letra representa a concentração de *Btí* aplicada nos bioensaios: A (20,0 µl/L), B (10,0 µl/L), C (5,00 µl/L), D (2,50 µl/L), E (1,25 µl/L), F (0,63 µl/L), G (0,31 µl/L), H (0,16 µl/L), I (0,08 µl/L) e J (0,04 µl/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo controle.

Os resultados demonstram que a alteração da temperatura, nos parâmetros estudados não interfere na toxicidade do novo formulado, pois a mortalidade das larvas foi de 100% ainda nas primeiras 24h do experimento, em todos os bioensaios. Não houve mortalidade no grupo controle.

Para a determinação das concentrações letais CL_{50} e CL_{90} , o resultado bruto de larvas mortas em relação às dosagens A-J foram avaliados por regressão logística de Morte por log (dose (µl)) e intervalos de confiança através do modelo Probit do programa XLSTAT (Tab. 3).

A CL_{50} foi estabelecida em 0,2949 µl/L com intervalo de confiança de 0,2438 – 0,3435 µl, bem como a CL_{90} ficou determinada em 0,6820 com intervalos de confiança de 0,6319 – 0,7228 µl. Para WHO (2005) a concentração diagnóstica é o dobro do valor estimado da CL_{99} . O resultado da CL_{99} foi calculado em 0,7845 com variações entre 0,7435 – 0,8355µl. Sendo assim a nossa CD ficou estipulada em 1,5690 µl/L.

Tabela 3 - Regressão logística de Morte por log (dose (μ l)) e intervalos de confiança através do modelo Probit do programa XLSTAT.

CL	Dose (μ l)	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
1,0	0,0502	0,0336	0,0694
5,0	0,0843	0,0600	0,1109
10,0	0,1112	0,0818	0,1424
20,0	0,1554	0,1190	0,1927
30,0	0,1978	0,1559	0,2397
40,0	0,2431	0,1965	0,2887
50,0	0,2949	0,2438	0,3435
60,0	0,3576	0,3027	0,4087
70,0	0,4395	0,3816	0,4920
80,0	0,5595	0,5007	0,6110
90,0	0,6820	0,6319	0,7228
99,9	0,7845	0,7435	0,8355

6.5 Determinação de Potência (UTI/ml) do novo formulado

A biopotência é calculada comparando-se a mortalidade das larvas de mosquito produzidas pelo produto em teste, com a mortalidade produzida pelo padrão de referência correspondente. A biopotência é medida em unidades internacionais tóxicas (UTI) por mg de produto. Atualmente existe apenas uma referência internacionalmente reconhecida que permite a determinação da biopotência usando bioensaios de preparações bacterianas para larvas de *Ae. aegypti*. A biopotência de produtos à base de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) é comparado com um pó de referência liofilizado (IPS82, estirpe 1884) desta espécie bacteriana, utilizando larvas iniciais do quarto estágio de *Ae. aegypti*. A toxicidade do IPS82 é arbitrariamente atribuída em 15 000 UTI / mg de pó contra essa espécie de inseto.

Para a análise de determinação de potência utilizou-se como base a CL₅₀ de 0,013 mg/L do IPS82. Sendo assim, a Potência do novo formulado de *Bti* ficou estipulada em 800 UTI/ μ L).

6.6 Avaliação do efeito residual do formulado de *Bti* tanto em local com água quanto em locais secos.

Após os cálculos de CL₅₀ e CL₉₀ foi realizado o teste de efeito residual que é feito com a finalidade de estipular a persistência da substância no ambiente. Somente a CL₉₀ foi avaliada quanto à residualidade (WHO, 2005). Após a realização dos ensaios, foi possível observar que ao utilizar a CL₉₀ para determinar o efeito residual da nova formulação de *Bti* em local com água, a média do índice de mortalidade apresentou uma queda linear, onde obtivemos 100% de mortalidade durante três dias. Entretanto, posteriormente a mortalidade larval diminuiu chegando ao 13^a dia com uma média de 50,66%. Houve mortalidade no grupo controle. Contudo, a mesma não ultrapassou 2% ao dia. A média das três repetições estão apresentados na figura 8.

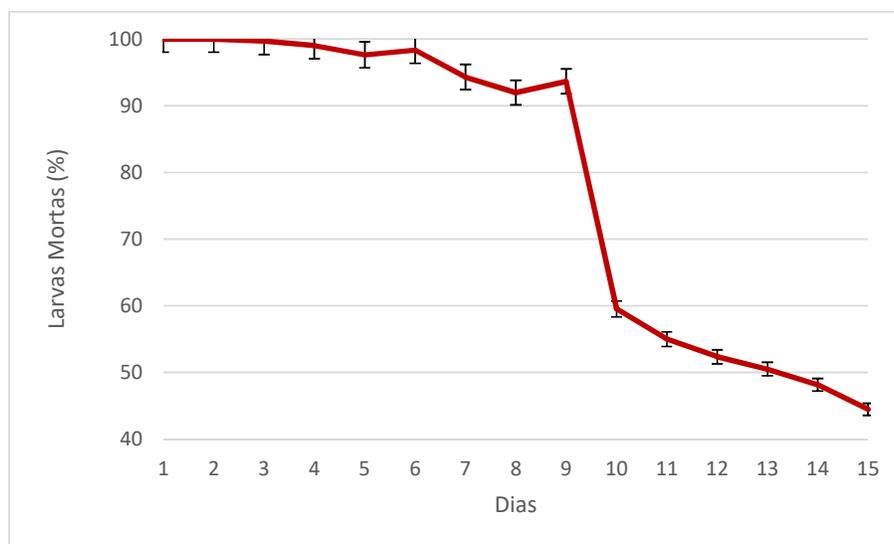


Figura 8 - Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* quando se usou a nova formulação de *Bacillus thuringiensis israelensis* na concentração de CL₉₀. Cada ponto representa a média diária de mortalidade larval. Não foi observada mortalidade no grupo controle.

6.7 Avaliação do Efeito residual do formulado de *Bti* em local seco

Para a determinação do efeito residual em locais secos, também foi utilizada a concentração de CL₉₀. Durante o mesmo período de 30 dias, houve mortalidade média de 98,38% das larvas até o 26º dia de análise. No 30º dia a mortalidade caiu para 87% conforme se pode observar na figura 9. Não houve mortalidade no grupo controle.

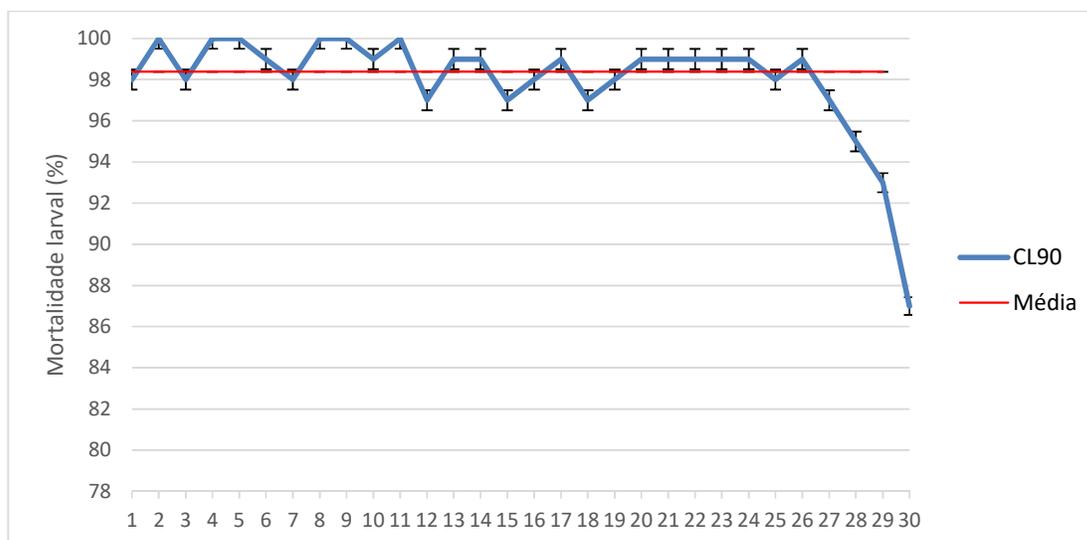


Figura 9 - Efeito residual do formulado de *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* quando testado a seco durante 30 dias. Cada ponto representa a média de mortalidade larval. Não foi observada mortalidade no grupo controle.

6.8 Efeito da Fitotoxicidade do novo formulado sobre *Lactuca sativa*

Os índices de porcentagem de germinação, medida das radículas e medida do hipocótilo apresentaram uma distribuição normal, foram significativos na análise de variância e foram submetidos ao teste de média. Os índices de velocidade de germinação também apresentaram uma distribuição normal quando submetidos ao teste de Shapiro-Wilk.

Na avaliação de porcentagem de germinação o grupo controle foi o que apresentou menor porcentagem (89,68%) enquanto o maior índice foi o da concentração "E" (96,43%). Entretanto, quando comparados estatisticamente, não apresentaram variação significativa (Fig. 10).

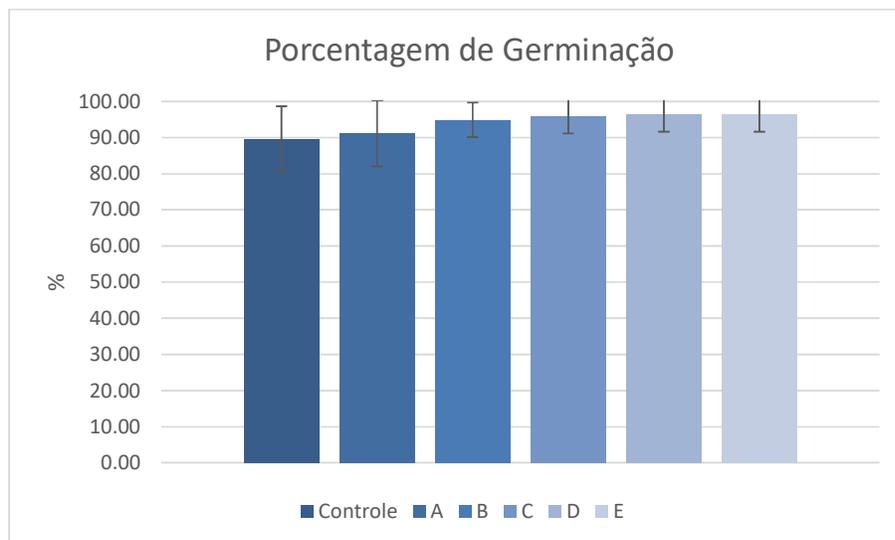


Figura 10 – Porcentagem de germinação obtida no teste de fitotoxicidade em *Lactuca sativa* tratada com *Bacillus thuringiensis israelensis*.

No teste de Índice de Velocidade de Germinação as concentrações “A” e “B” apresentaram resultados semelhantes à amostra controle, variando entre 3,27 e 3,28 cm. Entretanto, as concentrações maiores do formulado de *Bti* apresentaram resultados mais significativos, tendo o ápice do IVG em 3,48 na concentração “C”. (Fig.11)

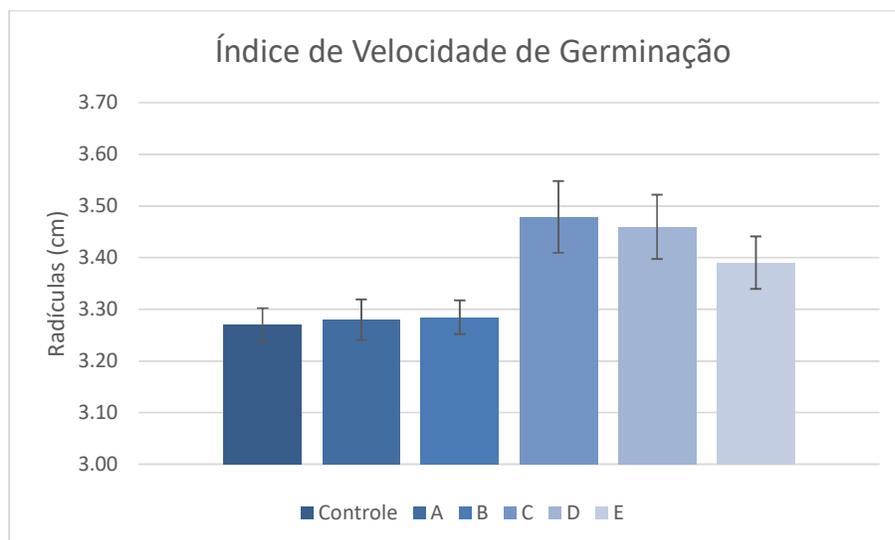


Figura 11 –Determinação do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em *Lactuca sativa* tratada com *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Tanto para a avaliação do tamanho das radículas (Fig. 12), quanto a variação no tamanho dos Hipocótilos (Fig. 13) as concentrações “A”, “B”, “C” e “D”, não variaram estatisticamente quando comparadas a amostra controle, tendo a variação máxima entre elas de 0,38 mm para o tamanho das radículas e 0,31 mm para o tamanho do hipocótilo. Contudo a concentração “E” apresentou um tamanho 26% menor do que o controle para o tamanho da radícula e 34% menor para o tamanho do hipocótilo.

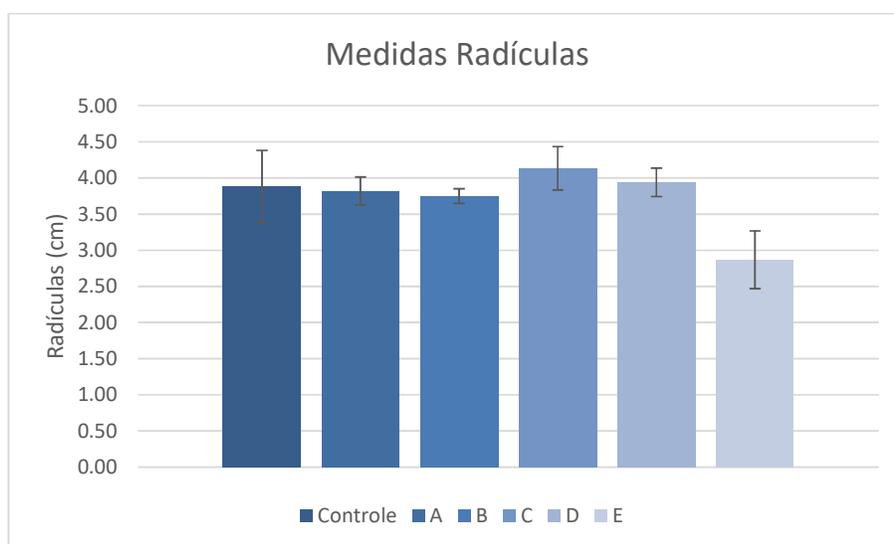


Figura 12 – Média dos tamanhos das radículas das plântulas de *Lactuca sativa* tratada com *Bacillus thuringiensis israelensis*.

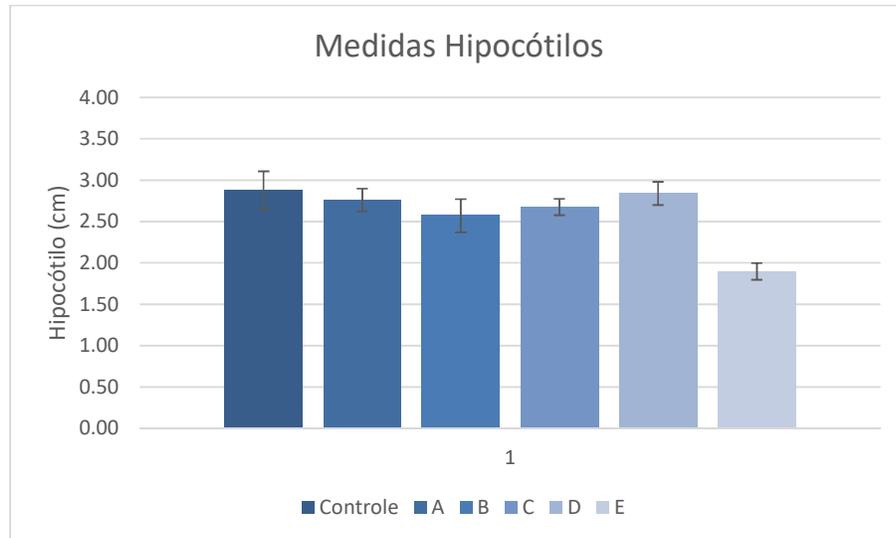


Figura 13 – Média dos tamanhos dos Hipocótilos das plântulas de *Lactuca sativa* tratada com *Bacillus thuringiensis israelensis*.

7. DISCUSSÃO

Diversos produtos biológicos estão disponíveis no Brasil para o controle de pragas e de insetos vetores, sendo as principais espécies de bactérias *Bacillus subtilis*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*. A qualidade dos produtos biológicos comercializados como inoculantes ou para uso no controle biológico de pragas na agricultura é fiscalizada por órgãos governamentais como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes visam o registro e a garantia para os consumidores/agricultores. Esta qualidade é avaliada basicamente por dois critérios: contagem de esporos/células e pureza.

Tendo em vista todos os procedimentos adotados para o controle de qualidade, bem como a experiência da empresa Simbiose-agro em desenvolver produtos biológicos e a utilização de uma cepa comercialmente conhecida, não se julgou necessário a utilização de métodos mais criteriosos para a verificação de pureza. Todas as características encontradas, tanto nas estruturas microscópicas quanto nas estruturas macroscópicas foram arbitrariamente referenciadas como características de *Bti*. As características fenotípicas encontradas em nossas colônias de *Bacillus thuringiensis* enquadram-se nas características descritas por outros pesquisadores. Porcar et al., (2004), descreveu as colônias de *B. thuringiensis* como colônias esbranquiçadas, grumosas, bordas irregulares, textura parecida com cera, margem lobulada. Características semelhantes foram descritas por Porcar (2004).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi descrita como um bacilo Gram-positivo de 1,0 e 1,2 μm de largura por 3,0 a 4,0 μm de comprimento (Moraes E Capalbo, 1981). As células vegetativas apresentam pouca movimentação e brilho. (Bergamasco, 2009). Os esporos normalmente estão localizados na região central no interior da célula mãe, possuem formato elipsoidal ou cuboide (Moraes E Capalbo, 1981). Apesar de não termos conseguido avaliar o formato elipsoidal ou cuboide dos esporos, devido ao tipo de microscopia utilizado, as demais características descritas tanto por Moraes & Capalbo, (1981) e Bergamasco (2009) são as mesmas encontradas em nosso estudo.

Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos pólos da célula (Lereclus, 1988; Höfte & Whiteley, 1989; Peferöen, 1997). Sendo assim, quanto maior for o número de esporos por ml, maior será a concentração de proteínas por ml, e conseqüentemente, menor será a dose de aplicação do inseticida. Tendo em vista estes aspectos um dos principais objetivos foi produzir um formulado com alta concentração celular de *Bti*. Para alcançar os níveis desejados de concentração, após o processo de fermentação, o caldo fermentado passou por um filtro tangencial, com membrana filtrante hidrofóbica. Como resultado deste processo, foi possível alcançar concentrações superiores a dez bilhões de esporos por ml. Contudo, como nos testes a intenção era avaliar somente os esporos viáveis, antes de realizarmos as análises de UFC, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico (80°C durante 15 min.). Neste caso, diferente das células vegetativas os esporos somente começam a degradar a temperaturas superiores a 80 °C (Valsechi, 2006). A média das análises de concentração ficou em $1,47 \times 10^{10}$ esporos viáveis por ml de produto ou $1,47 \times 10^7$ esporos/ μ L de produto.

Tendo em vista que a determinação da potência do formulado de *Bti* ficou estipulada em 1200 UTI/ μ L podemos concluir que para cada \sim 18 mil esporos viáveis, temos uma unidade internacional de toxicidade. Segundo Araujo (2006), dos produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* disponíveis no mercado brasileiro, existem somente sete formulações líquidas regulamentadas. Dentre estas, somente duas possuem as mesmas características de formulação (Suspensão Concentrada) do produto testado, sendo que estes produtos possuem garantias de potência 600 e 700 (UTI/mg). Sendo assim, para fins de comparação, determinamos que a potência do larvicida testado no presente estudo é satisfatória e encontra-se dentro dos padrões estabelecidos pelo mercado consumidor para este tipo de formulação. Entretanto, formulações de pó primário, pó molhável e granulados, ainda apresentam potências superiores, variando entre 2500 e 10000 UTI/mg (ARAUJO, 2006).

Referente a investigação da presença de determinadas proteínas no novo formulado, após a leitura do gel de SDS foi possível confirmar a presença de cinco proteínas, sendo três (60, 62, 120KDa) com pesos moleculares correspon-

dentos aos grupos das proteínas Cry procuradas (Cry10 e Cry4), respectivamente. A proteína com peso molecular de 73KDa refere-se a proteínas do grupo Cry3 que variam suas massas moleculares entre 73 e 75 KDa (Krieg et al, 1983). A proteína com peso molecular de 122KDa pertence ao grupo das proteínas Cry4 com peso molecular variando entre 106 e 124 KDa (Krieg et al, 1983). Dentre todas as proteínas encontradas, julga-se que as representantes da família Cry4 são as mais importantes para este estudo, pois esta família possui um complexo com apenas duas proteínas Cry4Aa e Cry4Ba, que apresentam altos índices de atividade contra insetos da ordem Diptera, a qual pertencem os mosquitos. Os genes *cry4A* e *cry4B* foram isolados das estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codificam proteínas de 135 e 120kDa, respectivamente. (Hofte E Whiteley, 1989) (Lereclus et al., 1989).

Como as proteínas da família Cry4, aquelas pertencentes à família Cry10 também possuem atividade larvívica contra insetos da ordem Diptera, este grupo de proteínas é constituída por apenas um subgrupo, o Cry10Aa. Esta toxina foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codifica uma proteína de 78 kDa, apresentando atividade contra *Ae. aegypti* (Thorne et al., 1986; Crickmore et al., 2012). Da mesma forma que Cry10Aa, a toxina do tipo Cry11Aa, também, foi isolada a partir de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codifica uma proteína de 72 kDa (Donovan et al., 1988). A proteína Cry11Ba foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* e apresenta alta eficácia contra os mosquitos das espécies *Ae. aegypti*, *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi* (Zhang et al., 2016). A Cry11Bb foi isolada *B. thuringiensis medellin* e é altamente tóxica às larvas de *Ae. aegypti*, *Anopheles albimanus* e *Culex quinquefasciatus* (Ordúz et al., 1998). Estas proteínas apresentam peso molecular de 81 e 84 kDa, respectivamente (Crickmore et al., 2012).

Finalmente, a família das proteínas Cry3 apresenta quatro integrantes: Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb e Cry3Ca. Essas toxinas apresentam peso molecular de 73 a 75 kDa (Crickmore et al., 2012) e produzem cristais romboides. Krieg et al., (1983) escreveram a primeira estirpe codificadora de gene *cry3*. Estas proteínas são tóxicas a insetos da Ordem Coleoptera.

Para a investigação do efeito larvicida, foi utilizado o protocolo descrito pela primeira vez pela Organização Mundial da Saúde em 1981 (WHO, 1981) e posteriormente com algumas modificações em 2005 (WHO, 2005). O objetivo deste documento é fornecer informações específicas, procedimentos padronizados e diretrizes para se testar larvicidas. O documento fornece orientações sobre como desenvolver estudos de laboratório em pequena escala e ensaios de campo em larga escala para determinar a eficácia dos produtos e estipular a concentração letal (CL) do larvicida para 50% e 90% de mortalidade (CL₅₀ e CL₉₀).

Para avaliar a atividade biológica de um larvicida de mosquito, deve-se utilizar larvas de mosquitos criadas em laboratório de idade conhecida ou instar (WHO, 1981). Cepas ou F1 de mosquitos coletados no campo devem ser expostas durante a 48 h ou mais em água tratada com o larvicida, avaliando várias concentrações dentro do seu intervalo de atividade.

O larvicida somente será considerado bom para a comercialização quando testes de mortalidade obtiverem um valor médio de todas as repetições de 50 % de efeito positivo nas primeiras 48h (ANVISA-2009). Avaliando os resultados bruto de larvas mortas em relação às dosagens de A-J, pode-se observar que todas as diluições de A-G foram consideradas satisfatórias para a atividade larvicida. Contudo, se poderia afirmar que a dosagem F (0,63 µl/L) é totalmente suficiente para o controle de larvas de *Ae. aegypti*. Para a dosagem “G” com ingrediente ativo de 0,31 µl/L e uma mortalidade média de 50% em 48h.

Quando expostos a diferentes temperaturas os resultados apresentados demonstram que as alterações das temperaturas, nos parâmetros estudados não interferem na toxicidade do novo formulado, pois em todas as temperaturas a mortalidade manteve-se em 100 % em menos de 24h. Em experimentos realizados por Frankenhuyzen et al., (2008), os mesmos obtiveram resultados semelhantes e descrevem que apesar da porcentagem de mortalidade ser a mesma entre as comparações de temperaturas, ocorreu uma variação no tempo de resposta. A mortalidade ocorreu mais cedo e progrediu mais rapidamente com o aumento da temperatura (13–25°C). Resultados parecidos foram descritos por Nayar et al., 1999, onde as amostras comparadas (15-35 °C) permaneceram por até 24 h com eficácia larvicida semelhante aos nossos resultados. Contudo no mesmo experi-

mento, autor mostrou que a dose necessária para conseguir uma CL₉₀ aumenta de 0,225 mg/litro (14°C) para mais do que o dobro dessa dosagem quando o bioensaio é realizado a 6°C. Resultados semelhantes foram apresentados numa pesquisa realizada para o controle de *Aedes vexans*, onde as larvas eram cerca de 10 vezes mais sensíveis ao *Bti* a 25°C (CL₉₀: 0,014 g/litro) do que a 5°C. (Becker & Rettich, 1994).

A resposta do larvicida testado difere do observado em teste realizados em inseticidas químicos por Rodrigues & Kaushik (1984), Piechowicz & Grodzicki (2013). Para estes autores os inseticidas organofosforados mostram uma correlação positiva entre o aumento da temperatura e o aumento da toxicidade, enquanto que os inseticidas organocarbamatos e piretróides mostram uma correlação negativa. Os resultados do ensaio mostram que o inseticida permetrina tem uma correlação negativa na faixa de temperatura de 16-30°C, uma correlação positiva na faixa de 30-32 °C e volta a mostrar uma correlação negativa na faixa de 32-34°C. Ressaltam os autores que esta variação na efetividade do inseticida com a variação na temperatura ambiente pode prejudicar o controle do mosquito e aumentar os riscos à saúde pública Piechowicz & Grodzicki (2013).

Devemos levar em consideração que em testes com diferentes temperaturas o efeito da mesma na toxicidade dos inseticidas não é linear, sendo que vários fatores podem explicar esta influência. No caso dos inibidores da enzima acetilcolinesterase, como os organofosforados (temefós) o aumento da toxicidade se dá pela maior absorção dos componentes químicos que são correlacionados a elevação da temperatura. Outros fatores a serem considerados são: o efeito da temperatura no estado funcional do organismo alvo com modificações no metabolismo, maior perda de água, aumento no consumo de oxigênio que podem aumentar a suscetibilidade do organismo alvo ao inseticida (Viswanathan & Krishna Murti, 1989).

Também deve ser ressaltado que a relação entre a termo-variação e a efetividade dos inseticidas deve ser considerada nas estratégias de campanhas de erradicação nas diferentes estações do ano, de modo a não comprometer os resultados das campanhas e aumentar os riscos à saúde pública (Khan & Akram, 2014). Os inseticidas ou larvicidas que apresentam um coeficiente de temperatura

positivo devem ser utilizados preferencialmente nas estações quentes, enquanto que àqueles com coeficiente de temperatura negativo devem ser utilizados nas estações mais frias para que não ocorra perda de eficiência do produto. Entretanto, como o novo formulado não sofreu interferência quanto as aplicações em diferentes temperaturas é possível que o mesmo possa ser utilizado tanto nas estações mais frias como nas que apresentam temperaturas mais altas, período no qual ocorre a maior incidência de *Ae. aegypti*.

Desta forma, os resultados observados aqui estão de acordo com o que vários estudos comprovaram, que os efeitos da temperatura sobre a toxicidade de inseticidas são complexos e dependem de cada produto em questão, do organismo alvo e das faixas de temperatura testadas (Viswanathanan & Krishna Murti, 1989).

O tempo aproximado de estabilidade das propriedades físico-químicas de uma solução pode ser simulado quando esta é submetida a stress térmico, pois temperaturas acima de 50°C aceleram o processo de degradação.

Observamos um leve decréscimo no índice de mortalidade após o terceiro dia de experimento. Acredita-se que a principal causa para esse decréscimo seja a redução do número de esporos presentes na água. Esta hipótese ficou comprovada com os resultados encontrados no experimento complementar, onde no início a concentração de UFC/ml de água era de $1,00 \times 10^5$. No 4º dia a concentração era de $7,33 \times 10^4$ e após o 13º dia a concentração havia diminuído para $3,50 \times 10^3$ células por ml. Ao avaliar a atividade residual de três larvicidas comerciais, Pontes et al., (2010) obtiveram resultados com os mesmos padrões, onde a concentração de *Bti* caiu abruptamente após dez dias de análise. Tendo em vista os resultados encontrados neste experimento, sugere-se que a redução no número de esporos esteja relacionada com o fato dos mesmos serem consumidos durante o processo de alimentação das larvas de *Ae. aegypti*. Por conseguinte, como nesse processo de avaliação as larvas são trocadas a cada 24h e a quantidade de *Bacillus* não é repostada, o decréscimo de sua concentração é inevitável. Contudo, uma forma de corrigirmos esta variável é aumentarmos a dose inicial de aplicação do *Bti*, utilizando-se concentrações superiores a CL_{90} . Segundo a Organização Mundial da Saúde a melhor dose para ser utilizada é a menor concentra-

ção com 100% de mortalidade em 48h. Dessa forma, a relação de esporos/larva será aumentada o que ocasionará um aumento residual significativo.

Tendo em vista que uma das formas de aplicação que pretendemos recomendar a aplicação do *BTI* é a pulverização em grandes áreas com potencial foco de larvas, mesmo estas não contendo água, por exemplo ferros velhos a céu aberto ou até mesmo plantações irrigadas. Assim, a avaliação da persistência das proteínas de *Bti* nos ambientes secos nos apresenta a possibilidade de avaliar tais situações. Com os resultados deste experimento, pode-se estabelecer a viabilidades das aplicações nestes locais bem como prever de quanto em quanto tempo deveremos fazer a reaplicação do larvicida.

Diferente do efeito residual em locais com água, no processo de avaliação em locais secos a quantidade de *Bti* dá uma reposta diária. Desta forma, o decréscimo de sua ação larvicida ocorre somente quando realmente existe alguma degradação das proteínas ativas. Duchet, (2014) descreve que os esporos de *Bti* podem persistir no ambiente (outdoor) por meses após o tratamento. Seus resultados revelam que a permanência do *Bti* no ambiente após um tratamento é bastante influenciada pela quantidade aplicada inicialmente bem como pelo número de tratamentos realizados. Outro fator importante é o tipo de vegetação encontrada na área de aplicação pois a presença de matéria orgânica afetou a persistência dos esporos tanto no campo como no laboratório. Entretanto, a salinidade e o nível de água não influenciaram a persistência dos esporos em condições controladas.

A radiação solar e o calor intenso são considerados os fatores mais importantes na limitação do uso de produtos biológicos no controle de vetores, pois as proteínas sofrem desnaturação pela ação do calor e pela luz UV (Navon 2000, Myasnik et al., 2001). Diversos estudos sobre a atividade de larvicidas bacterianos em campo tem demonstrado que a luz solar, em especial a radiação ultravioleta (UV) é um dos fatores que mais afeta a persistência destes produtos, por causarem a inativação das toxinas (Obeta, 1996; Nayar et al.1999; Melo-Santos et al. 2001; Araújo, 2003).

Para minimizar essas limitações, a tecnologia empregada na formulação do larvicida conta com dois tipos de protetores os quais aumentam a persis-

tência em campo destes larvicidas devido à proteção contra a radiação ultravioleta e variações de temperatura (Schnepf et al., 1998; Tamez-Guerra et al., 2000; Côté et al., 2001). Desta forma foi possível manter a integridade dos cristais por mais de 30 dias, contrariando a maioria dos resultados apresentados com formulações líquidas (Navon 2000).

Referente a avaliação da fitotoxicidade do novo formulado sobre plantas *Lactuca sativa* as porcentagens de germinação ficaram um pouco abaixo do esperado. Segundo o fornecedor da semente, a taxa de germinação é de no mínimo 98%, valor que vem ao encontro com o apresentado por Marini, (2008) e Fujiwara, (2017), onde a PG obtida com sementes de *Lactuca sativa* foi de 99%, ensaio realizado com 50 sementes em 3 repetições e 4 réplicas nas mesmas condições do nosso experimento. Contudo, para Bufalo, (2012) a PG ficou entre 87 e 93% nas mesmas condições de análises, resultado este que está de acordo com os encontrados no nosso experimento. Essa variação na PG pode se dar pela qualidade das sementes pois sementes mais velhas podem diminuir a PG (Silva et al., 2008).

No teste de IVG as concentrações maiores do formulado de *Bti* apresentaram índices maiores. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa, (2014) em um experimento realizado com sementes de Algodão tratadas com *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk). Contudo, no mesmo experimento o autor cita que esta mesma estirpe de Btk quando inoculada na semente da cultivar BRS Aroeira apresentou efeito inibitório na velocidade de emergência e no crescimento das plantas. Para Martins et al., (1999), uma germinação rápida e uniforme das sementes, seguida por imediata emergência das plântulas são características altamente desejáveis, pois quanto mais tempo a plântula permanecer nos estádios iniciais de desenvolvimento e demorar a emergir no solo, mais vulnerável estará às condições adversas do meio. Tais resultados apontam que as estirpes de Bt podem interferir no IVG das plantas, variando com a espécie de planta testada.

As concentrações “normais” de aplicação do novo formulado não tiveram interferência no desenvolvimento das plântulas, sendo que o tamanho das radículas, e dos Hipocótilos mantiveram-se semelhantes aos do controle. Entretanto, quando se aplica doses mais elevadas (1000xCD) algumas alterações já se

apresentam nos tamanhos tanto das radículas quanto dos hipocótilos. Contudo, esta concentração não é considerada tóxica à planta. Gomes et al., (2003) demonstraram que duas bactérias, *Btk* e *Bacillus pumilus*, isoladas de plantas de couve, aumentaram o crescimento de alface cultivada em casa de vegetação.

O fato de concentrações mais elevadas do formulado de *Bti* estimular o IVG e inibirem o crescimento da parte aérea da planta pode ser explicado pelo fato de que as bactérias endofíticas podem ter esta característica, estimular o crescimento de plantas em um estágio de desenvolvimento e inibir em outro (Sturz et al., 2000).

8. CONCLUSÃO

O novo formulado de *Bacillus thuringiensis israelensis* possui uma concentração de bactérias acima da sua garantia;

As bactérias, durante o período de fermentação possuem a capacidade de sintetizar proteínas do grupo Cry 4 e Cry 10.

O novo formulado apresenta características que atendem as necessidades do mercado, apresentando resultados efetivos no controle de larvas de *Ae.aegypti* sob diferentes temperaturas e permanece com característica virulenta tanto em ambientes com água, quanto em ambientes secos.

O novo formulado não apresenta efeitos fitotóxicos a plantas *Lactuca sativa*, nos parâmetros avaliados.

9. REFERÊNCIAS

- Aldama PC, Garcia FJH. 2001. Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. *Acta Pediátrica de México*. 22: 114-117.
- Andrade CFS, Branco ACJ. 1991. Susceptibilidade de populações de *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* Kollar, 1832 (*Culicomorpha*, *Simuliidae*) ao *Temephos* e a um formulado à base de *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Revista Saúde Pública*. 25(5): 367-370.
- Andrade LF, Davide LC, Gedraite LS. 2010. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 626-631.
- Araujo AP. 2006. **Avaliação de um biolarvicida à base de *Bacillus thuringiensis sorovar. israelensis*, desenvolvido no Brasil, para o controle do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Araújo CJPC, Lacey LA. 1990. Controle de simulídeos com concentrado emulsional de *Bacillus thuringiensis*. *Boletim de la Oficina Sanitária Panamericana*. 108(3): 213-219.
- Arcy AR, Silva M, Cunha TL. 2014. **Ecotoxicological testing of different formulations of bioinsecticide produced at UNIVILLE subjected to a shelf test**. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-1522014000400435>. Acesso em 18 jun. 2018.
- Barosa J, Ferreira A, Fonseca B, Souza I. 2003. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha.
- Becker N, Rettich F. 1994. Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 4:527-533.
- Ben-Jacob E, Cohen IE, Gutnick DI. 1998. Organização cooperativa de colônias bacterianas: do genótipo ao sorotipo. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 779-806.
- Bentley MD, Day JF. 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. *Annual Review of Entomology*. 34: 401-421.
- Bergamasco VB. 2009. **Identificação de Genes Cry1 em isolados de *Bacillus thuringiensis* e expressão do gene cry1La em *Escherichia coli* visando o controle de pragas da cultura algodoeira**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BIOMEDICINA. **Descriminação morfológica de colônias**. 2013. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/08/descricao-morfologica-de-colonias-em.html>> Acesso em 12 set. 2017.
- Bisset, J. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 54: 202-219.
- Boyce R et al. 2013. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop Med Int Health*. 18(5):564-77.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to

- temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99(2)
- Braga IA, Valle D. 2007. *Aedes aegypti*: Vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epid. e Serv. de Saúde. 16(4): 295-302.
- Bravo A et al. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends in Biotechnology. 26(10): 573-579.
- Buffalo J et al., **Stratification periods in seeds germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under different conditions of light and temperature**. 2012. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/download/6619/10880>> Acesso em 19 jul. 2018.
- Burt FJ et al. 2012. Chikungunya: a re-emerging virus. Lancet. 379(9816): 662-671.
- Cao-Lormeau VM et al. 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. Emerg Infect Dis 20: 1084-1086.
- Caron M et al. 2012. Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito co-infections in Gabon, Central Africa. Clin Infect Dis 55:45-53.
- Carrera M.1991. **Inseto de Interesse Médico e Veterinário**, II, UFPR. Curitiba. 228p.
- Chagas MER. 2012. **Efeito do PH e do ácido acético sobre a população de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* a partir de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.
- Christopher SR. 1960. ***Aedes aegypti* (L.). The Yellow Fever Mosquito**, I, Cambridge University Press, London, 739p.
- Cirimotich CM et al. Natural microbe-mediated refractoriness to plasmodium infection in anopheles gambiAe. Science. 332:855–858.
- Clements AN. 1999. **The Biology of Mosquitoes**, II, Egg laying. Cabi, Wallingford. 571p.
- Consoli RAGB, Oliveira RL.1994. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**, I, Fiocruz, Rio de Janeiro. 228p.
- Costa FSS. ***Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: Avaliação de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda***. 2014. Disponível em:<http://repositrio.unB.br/bitstream/10482/16821/1/2014_FlaviaSantanaSouzadaCosta.pdf> Acesso em 19 jul. 2018.
- Côté JC, Vincent C, Son KH, Bok SH 2001. Persistence of insecticidal activity of novel bio-encapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). Phytoprotection 82: 73-82.
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf BE, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. 2012. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- Cunha MCI, Bassi RMA. 1997. Ensayo con *Bacillus thuringien-*

- sis* var. *israelensis* sobre simúlidos (Diptera, Simuliidae) en el río São João, Paraná, Brasil. *Acta Biológica Paranaense* 26(2): 9-21.
- Daffre S. **Artrópodes Vetores**. 2013. Disponível em: http://lineu.icB.usp.br/farmacia/ppt/Vetores_parte1_2013.pdf. Acesso em 25 jul. 2016.
- de Barjac H, Larget-Thiéry I 1984. **Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations**. Mimeographed document WHO/VBC/84.892. World Health Organization, Geneva.
- de Barjac H. (1978). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles*. 286: 1175-1178.
- De Maagd RA, Bosch D, Stiekema W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Sciences*. 4: 9-13.
- Debach P. 1968. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. I, Continental, México. 927p.
- Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 46:509–520.
- Donalisio MR, Glasser CM. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Rev. bras. epidemiol*. 5(3): 259-279.
- Douchet C et al. 2008. Effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* on a natural population of *Daphnia pulex* in field microcosms. *Chemosphere*, Oxford. 74(1) -77.
- Duffy MR et al. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536-2543
- Dutra HI et al. 2015. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes *PLoS Negl Trop Dis*. 23(9): 155.
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88: 252-259.
- Figueiredo LTM. 2007. Arboviroses emergentes no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 40(2) 224-229.
- Finkler CLL, Finkler L. 2012. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-PlantFermenters. *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. InTech, 613-626.
- Forattini OP. 2002. **Culicidologia Médica**, II, USP, São Paulo, 860p.
- Frankenhuyzen KV, Régniere J, Berniercardou M, 2008. Response of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp.kurstaki at different ingested doses and temperatures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99: 263–274.
- Fujiwara GM et al. 2017. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. 139:238-244
- Gadelha DP, Toda AT. 1985. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Malariol*. 37: 29-36.
- Gill PS, Patricia V, 1992. The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp.

- shandongiensis: Characterization and screening for insecticidal activity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 59(3): 295-302.
- Glare TR, Callaghan M. 1998. Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Ag_Research*. 58.
- Gomes AMA, Mariano RLR, Silveira EB, Mesquita JCP. 2003. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Horticultura Brasileira*, 21:699-703.
- Gomes AS et al. **Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo**. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0-037-86822006000400002&lng=pt&tlng=pt> Acesso em 10 jun. 2017.
- Granek JA, Magwene PM. 2010. Determinantes ambientais e genéticos da morfologia das colônias em leveduras. *PLoS Genet*. 6:823
- Guzman M, Halstead S, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler D, Peeling R, 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews*. 8(12): 7–16.
- Habib MEM, Andrade EFS. 1998. **Bactérias Entomopatogênicas**. In: Alves, S.B. (ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. II, FEALQ, Piracicaba, p 383-446.
- Häder DP, Richter P. 2009. *Curso avançado de biologia marinha: experimen Joinville (Univille)*.
- Höfte H, Whiteley HR, 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Microbiology Reviews*. 53(2) 242–255.
- Ihara H, Kuroda E, Wadano A, Himeno M, 1993. Specific Toxicity Of Delta-Endotoxins From *Bacillus Thuringiensis* To Bombyx Mori. *Biosci. Biotech. Biochem*. 57:200-204.
- Ioos S, Mallet HP, Goffart IL, Gauthier V, Cardoso T, Herida M 2014. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 44: 302-307.
- Jung YC, Kim SU, Cote JC. 1998. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. higo strain isolated from rice bran in Korea. *Journal of Invertebrate Pathology*, Orlando, 71: 95-96.
- Kay BH, Nam VS, Tien TV, Yen NT, Phong TV, Diep VT, Ninh TU, Bektas A, Aaskov JG, 2002. Control of *Aedes* vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of *Mesocyclops* (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 66: 40-48.
- Kellen WR, Meyers CM. 1964. *Bacillus sphaericus* neide as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 7: 442-448.
- Knowles BH, 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal - endotoxins. *Adv. Insect Physiol*. 24: 275-308.
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 30;4
- Krieg A, Huger AM, Langenbruch GA, Schnetter W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. *Zeitschrift für angewandte Entomology*. 96: 500-505.
- Laemlli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lardeux F, Sechan Y, Loncke S, Deparis X, Cheffort J, Faarua M, 2002. Integrated control of peridomestic larval habitats of *Aedes* and *Culex* mosquitoes

- (Diptera: Culicidae) in atoll villages of French Polynesia. *J Med Entomol.* 39(3):493-8.
- Lecadet MM, Chaufaux J, Ribier JE, Lereclus D, 1991. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.840-849.
- Lereclus D, 1988. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. *Bulletin de l'Institut Pasteur, Paris*, v.86, p.337-371.
- Liang Y, Patel SS, Dean D H, 1995. Irreversible Binding Kinetics Of *Bacillus Thuringiensis* Cryia - Endotoxins To Gypsy Moth Brush Border Membrane Vesicles Is Directly Correlated To Toxicity. *J. Biol. Chem.* 270:24719-24724.
- LIMA et al. **Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará.** 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000300006 > Acesso em 25 Set. 2017.
- Lozovei AL, Da Cunha MCI, De Oliveira VLR. 1992. Controle físico de Simuliídeos (Diptera, Simuliidae) em vertedouros de açudes de piscicultura e no leite do Rio Don Rodrigo, Campo Largo, Paraná, Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 35(4): 679-684.
- Lozovei AL. 2001. **Culicídeos (Mosquitos).** In Marcondes C B (org.), *Entomologia médica e veterinária*. I, Atheneu, São Paulo, 432p.
- Marini P et al. 2008. Qualidade fisiológica de sementes e crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas ao nitrogênio. *Rev. bras. sementes.* 31(1): 222-227.
- Martinez EM. 1990. **Dengue hemorrágico em crianças**, I, Hucitec, São Paulo, 180p.
- Martínez-Ibarra JA, Guillén YG, Arredondo-Jiménez J, Rodríguez López M, 2002. Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in Southern México. *BioControl*, 47(4): 481-486.
- Martins CC, Nakagawa J, Bovi ML. 1999. Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de palmito-vermelho (*Euterpe espírito santensis* Fernandes – Palmae). *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 21(1):164-173.
- McCray EM Jr, Umphlett CJ, Fay R, 1973. Laboratory studies on a new fungal pathogen of mosquitoes. *Mosquito News.* 33:54-60.
- McInnis T, Zattau WC, 1982. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Leptolegnia*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 39:98-104.
- Mcmeniman CJ, Lane RV, Cass Bn, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science.* 2;323.
- Melo-Santos MAV, Sanches, EG, Jesus FJ, Régis LN, 2001. Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 859-860.
- Monath TP. 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 2395-2400.
- Monnerat RG, Bravo A. 2000. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de ação e resistência.** *Controle Biológico*

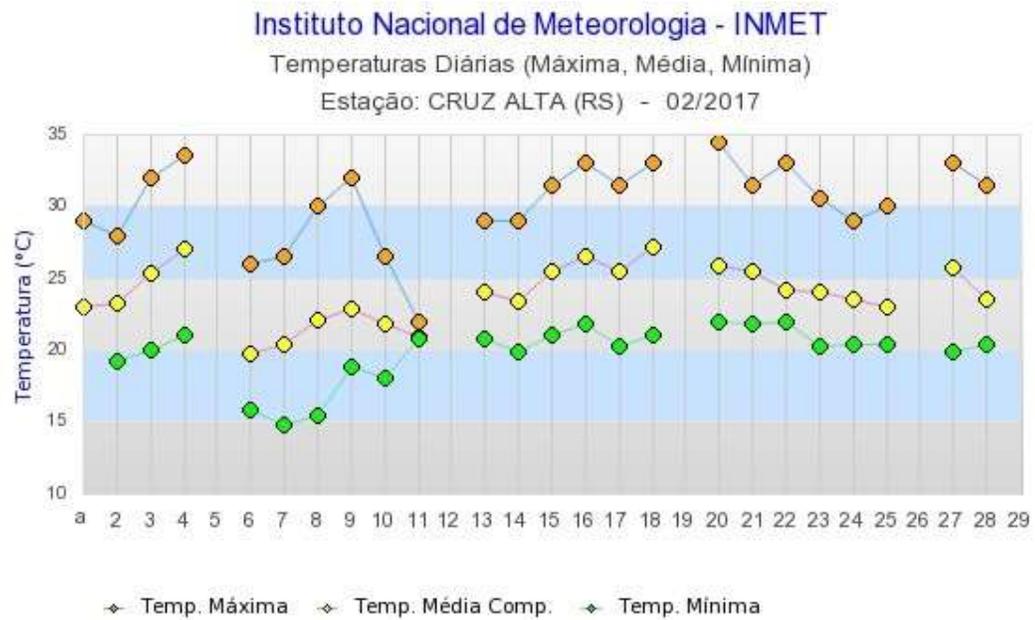
- co, III. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna 163-200p.
- Moore CG, Mitchell CJ, 1997. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis.* 3:329-34.
- Moraes IO, Capalbo DMF. 1981. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: Manole. p.297-310.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and plasmodium. *Cell.* 139(7):1268-78.
- MS - Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico: Ministério da Saúde divulga novos casos de microcefalia.** 2015. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/211-64-ministerio-da-sau-de-divulga-novos-casos-de-microcefalia> . Acesso em 15 Jun. 2017.
- MS – Ministério da Saúde. **Saiba como é o ciclo do mosquito *Aedes aegypti*.** 2017. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/combate-ao-Aedes/53105-saiba-como-e-o-ciclo-do-mosquito-Aedes-aegypti> Acesso em 12 ago. 2017.
- Nagai S, Nishizawa Y, Onodera M, Aiba S. 1971. Efeito do oxigênio dissolvido sobre o rendimento do crescimento e atividade da aldolase na cultura do quimioestado de *Azoto bacterivelandii*. *J. Gen. Microbiol.* 66: 197-203.
- Nam AC, Nguyen TY, Phong TV, Ninh LY, Mai IQ, Ngo NT, 2005. Elimination of dengue by community programs using *Mesocyclops* (Copepoda) against *Aedes aegypti* in central Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72: 67-74.
- Navon A. 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. *Crop Prot.* 19: 669-676.
- Nayar JK, Knight JW, Aly A, Carlson DB, O'Bryan BD, 1999. Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against two Florida mosquito species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 21-41.
- Obeta JAN. 1996. Effect of inactivation by sunlight on the larvicidal activities of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* H-14 isolates from Nigerian soils. *J. Comun. Dis.* 28: 94-100.
- Orduz S, Realpe M, Arango R, Murillo L, Delécluse A 1998. Sequence of the cry11Bb1 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochim Biophys Acta* 1388: 267-272.
- PAHO - Pan American Health Organization 1995. Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Washington (DC). Technical Paper, 42.
- Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88: 91-142.
- Paula AR et al. 2008. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology.* 18(1): 1017-1025.
- Peferoen M, 1997. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends in Biotechnology.* 15: 173-177.
- Pereira CR et al. 2009. Short Communication: The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti*

- (Diptera: Culicidae) larvAe. *Biocontrol Science and Technology*. 1(1) 1-6.
- Piechowicz B, Grodzicki P & Stawarczyk Michal and Stawarczyk K. 2013. Circadian and Seasonal Changes in Honeybee (*Apis mellifera*) Worker Susceptibility to Diazinon, Teflubenzuron, Pirimicarb, and Indoxacarb. *Polish J Environ Stud*, 22:1457-1463.
- Piechowicz B, Grodzicki P, Stawarczyk M, Stawarczyk K, 2013. Circadian and Seasonal Changes in Honeybee (*Apis mellifera*) Worker Susceptibility to Diazinon, Teflubenzuron, Pirimicarb, and Indoxacarb. *Pol. J. Environ. Stud.* 22(5):1457–1463
- Porcar M, Juárez V. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis* el control biológico, Uni. Nacional de Colombia. 69-100.
- Rabinovitch L, Silva CMB, Alves RSA, 2000. **Controle Biológico De Vetores De Doenças Tropicais Utilizando Bacillus Entomopatogênicos**. In: Melo IS; Azevedo JL, *Controle Biológico*, II, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna 17-90p.
- Ravoahangimalala OJ, Charles F, Schoeller-Raccaud J, 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae Diptera: CulicidAe. *Research in Microbiology*. 144: 271–278.
- Rodrigues CS, Kaushik NK, 1984. The effect of the temperature on the toxicity of Temephos to black fly (Diptera: Simuliidae) larvAe. *Canadian Entomology*, 116:451-455.
- Ruas NAL, De Caldas EP, Souza MAT. 1984. Programa Estadual de Controle de Borrachudos: controle de simuliídeos no Rio Grande do Sul, aspectos gerais. *Boletim de Saúde* 11(2): 4-7.
- Samir N, Elena MU, Mieke WH, Stefan D, Ivan M, Maagd RA 2006. Carboxy-terminal effects on crystal formation and insecticidal properties of colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Mol. Biotechnol.* 21: 185-196.
- Santos MAVM. 2008. ***Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da Região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife.
- Schnepf E, et al, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 775-806.
- Schnepf E, Whiteley HR. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA*. 78: 2893-2897.
- Schnepf E, et al. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol.* 62: 775-806.
- Scholte EJ et al. 2007. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91: 43-49.
- Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL, 2002. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, 433p.
- Shapiro JA. 1992. Padrão e controle no desenvolvimento de colônias bacterianas.

- Sci. Prog. 76: 399-424.
- Shimada Y, nakahara A, Matsushita M, Matsuyama T. 1995. Padrões espaciotemporais produzidos por bactérias.
- SILVA E. A. et al. **Germination of seeds and production of seedlings of lettuce cultivars at different substrates**. 2008. Disponível em: <http://www.fisiologiavegetal.ufc.br/APOSTILA/DORMENCIA_GERMINACAO.pdf> Acesso em 19 jul. 2018.
- Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN, 2004. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37: 396-399.
- Silva JLR, Schwalm FU, Silva CE, Costa M, Heermann R, Silva OS. 2017. Larvicidal and Growth-Inhibitory Activity of Entomopathogenic Bacteria Culture Fluids Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Econ Entomol. 110(2): 378-385.
- Silva OS et al. 2013. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 112(8):2891-2896.
- Soares AMVM. 1991. Ecotoxicologia e Determinação de Riscos Ecológicos. Prática e Perspectivas. In: Conferência nacional Sobre A Qualidade Do Ambiente. Universidade de Lisboa.
- Souza MAT, Mardini LLF, Gomes EC e Da Silveira GL. 1994. Evolução do Controle Biológico de Simulídeos através do *Bacillus thuringiensis israelensis* no Rio Grande do Sul, Brasil. Informe do Programa Estadual de Controle dos Simulídeos da Divisão de Zoonoses e Vetores da Secretaria de Saúde e Meio Ambiente, Rio Grande do Sul, 15 p.
- Sturz AV, nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied Soil Ecology 15: 153-190.
- Tamez-Guerra P, Mcguire MR, Behle RW, Shasha BS, Wong LJ. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 93: 219-225.
- Thorne L, Garduno F, Thompson T, Decker D, Zounes, M, Wild M, Walfield AM, Pollock TJ, 1986. Structural similarity between the lepidoptera and diptera specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and *israelensis*. J. Bacteriol. 166(3): 801-811.
- VALESCHI. **Microbiologia dos Alimentos**. 2006. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Microbiologia%20dos%20Alimentos.pdf>> Acesso em 12 Set. 2017.
- Van Rie J, Jansens S, Hofte H, Degheele D, Van Mellaert H, 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. European. Journal of Biochemistry. 186:239-247.
- Viswanathan Pn, Krishnamurti CR, 1989. Effects of temperature and humidity on ecotoxicology of chemicals. Ecotoxicology and Climate. 139-154.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. Nature. 476(7361):450-453.

- WHO - World Health Organization. 1999. **Guideline specifications for bacterial larvicides**. Geneve.
- WHO - World Health Organization. 1981. **Report of infromal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H-14**. Mimeographed documents TDR/BVC/BTH-14,WHO/VCB/81-828, Geneve.
- WHO - World Health Organization. 1997. **Dengue hemorrhagic fever, Diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneve.
- WHO - World Health Organization. 1997. **Vector control methods for use by individuals and communities**. Geneve.
- WHO - World Health Organization. **Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas**. 2015. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en> Acesso em 15 Ago. 2017.
- Wilke BM, Riepert F, Koch C, Kühne T. 2008. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70: 283-293.
- Wimpenny JWT. 1992. Sistemas microbianos - padrões em tempo e espaço. *Adv. MicroB. Ecol.* 12: 469-522.
- Zaltauskaitė J, Cypaitė A. 2008. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. *Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. Environmental Research - Engineering and Management* 46: p.42-47.
- Zhang Q, Hua G, Adang MJ. 2016. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvAe. *Insect Science*, 24: 714-729.

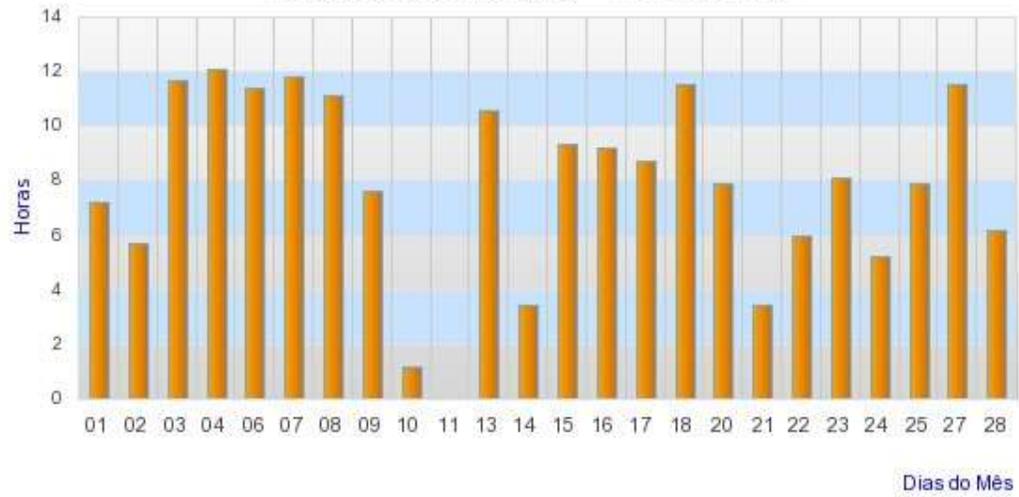
10. ANEXOS



Instituto Nacional de Meteorologia - INMET

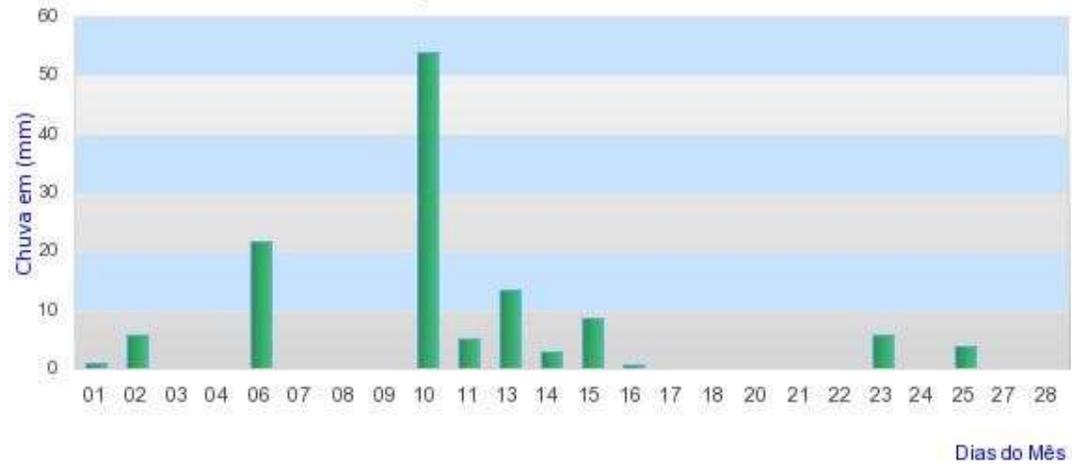
Insolação Total Diária

Estação: CRUZ ALTA (RS) - Fevereiro/2017



Instituto Nacional de Meteorologia - INMET

Chuva Acumulada 24h
Estação: CRUZ ALTA - 02/2017



Instituto Nacional de Meteorologia - INMET

Chuva Acumulada Mensal X Chuva (Normal Climatológica 61-90)
CRUZ ALTA (RS) - Para o Ano: 2017

