



**Universidade Federal do Maranhão**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança**  
**Mestrado Acadêmico**



**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Bacillus thuringiensis*  
BERLINER, 1911 DO CERRADO MARANHENSE EM  
LARVAS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (DIPTERA,  
CULICIDAE)**

**Katiane dos Santos Lobo**

**São Luís  
2015**

**KATIANE DOS SANTOS LOBO**

**Isolamento, caracterização molecular e avaliação da toxicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do Cerrado Maranhense em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança.

**ORIENTADOR:** Dr<sup>a</sup> Valéria Cristina Soares Pinheiro

São Luis

2015

Lobo, Katiane dos Santos.

Isolamento, caracterização molecular e avaliação da toxicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do cerrado maranhense em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera Culicidae / Katiane dos Santos Lobo. — São Luís, 2015.

107 f.: Il.

Orientador: Valéria Cristina Soares Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança, 2015.

1. Dengue – Controle biológico. 2. *Bacillus thuringiensis* – Cerrado maranhense. 3. *Aedes aegypti*. 4. Vetor. I. Título.

CDU 616.98:595.771(812.1)

**KATIANE DOS SANTOS LOBO**

**Isolamento, caracterização molecular e avaliação da toxicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do Cerrado Maranhense em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança.

**APROVADO EM:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Valéria Cristina Soares Pinheiro**

Doutora em Entomologia  
Universidade Estadual do Maranhão

---

**Sally Cristina Moutinho Monteiro**

Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Livio Martins Costa Junior**

Doutor em Parasitologia  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Flavia Castelo Branco Vidal Cabral**

Doutora em Ciências  
Universidade Federal do Maranhão

**À minha família (irmãos e sobrinhos)  
pelo amor e carinho, em especial aos meus  
queridos pais: Maria Antonia dos Santos e  
Cláudio dos Reis Lobo (*in memoriam*), que  
incondicionalmente sempre me apoiaram.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que ele tem concedido em minha vida, pelos problemas e pela sabedoria em resolvê-los;

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança, ao corpo docente, pelos ensinamentos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa e apoio ao projeto;

Ao Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA, pela concessão do espaço para a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro (CESC/UEMA) pela orientação, confiança e oportunidade, o que tornou possível a realização desse trabalho, e por ter me acompanhado em toda minha vida acadêmica;

À Ma. Joelma Soares da Silva (UFMA/Campus Codó-MA) pela relevante contribuição para a realização deste trabalho, ensinamentos e discussões que me fizeram crescer como profissional;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela parceria;

Aos meus pais, pelos ensinamentos, amor, carinho e compreensão, à minha família (irmãos e sobrinhos) pelo apoio e principalmente pela base familiar que sempre foi muito importante e me deu forças, especialmente ao meu pai *Cláudio dos Reis Lobo* que não mais se encontra entre nós;

À Ma. Juliana Maria Trindade Bezerra pelas contribuições e por todo o incentivo ao longo da minha vida acadêmica;

À Profa. Dra. Maria Cleoneide da Silva (CESC/UEMA) pelos ensinamentos e pelo auxílio e contribuição nas análises estatísticas;

A todos os meus amigos do Laboratório de Entomologia Médica (CESC/UEMA) pelo companheirismo e principalmente pela paciência do convívio do dia-a-dia;

Aos meus colegas de curso, em especial à turma 10/2013;

Às amigas Rosane Santana (irmã postíça), Florenir Glória Paes (mãe postíça) e Sabrina Silva pelo companheirismo, amizade e palavras de apoio nas horas difíceis;

Ao meu noivo Antonio Augusto Lima de Sousa pelo amor, carinho, força e paciência nos momentos difíceis;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento fazendo esta vida valer a pena.

*“No meio da dificuldade  
encontra-se a oportunidade”*

**Albert Einstein**



## RESUMO

Atualmente a dengue é um grave problema de saúde pública mundial, no Brasil verifica-se aumento do número de casos a cada ano e a circulação de vários sorotipos virais. O desenvolvimento de novas estratégias para o controle do *Aedes aegypti* é de extrema importância, para minimizar ou erradicar os casos da doença. Uma alternativa para o controle deste vetor é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis*, que apresenta toxicidade a essa ordem de inseto de importância epidemiológica. Neste estudo, buscou-se investigar o controle biológico de *A. aegypti*, com o uso de *B. thuringiensis* isolados do Cerrado Maranhense. Foram realizados bioensaios seletivos para determinar a atividade entomopatogênica contra as larvas de *A. aegypti*, bioensaios quantitativos com a finalidade de determinar a toxicidade dos isolados, por meio da estimativa da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) e testes de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para verificar a presença de genes mosquitocida (*cry* e *cyt*). A partir de 45 amostras de solo coletadas em 17 municípios do estado, obteve-se 1225 colônias bacterianas, sendo 383 (31,26%) identificadas como *B. thuringiensis*. Dos 383 isolados testados, 12 (3,13%) mostraram atividade larvicida superior a 50% (BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 131, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 401, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560), aos quais foram selecionados para posterior realização do bioensaio quantitativo e caracterização molecular. Os bioensaios quantitativos permitiram observar que os menores valores de CL<sub>50</sub> foram obtidos com o isolado 401 ( $4,0 \times 10^4$  esporos-cristais/mL) e com a bactéria padrão *Bti* ( $0,32 \times 10^7$  esporos-cristais/mL). Os demais isolados testados mostraram baixa atividade larvicida. Os testes de PCR mostraram que dos oito genes testados: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*, cinco destes: *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa* foram detectados em dez isolados, estando ausentes em apenas dois dos 12 isolados testados. Esses dados demonstram que os isolados de *B. thuringiensis* do Cerrado Maranhense apresentaram alta patogenicidade e potencial para o controle biológico de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** Dengue, Vetor, *Bacillus thuringiensis*, Controle biológico.

## ABSTRACT

Currently dengue is a serious global public health problem, in Brazil there is increase in the number of cases every year and the circulation of several serotypes. The development of new strategies for the control of *Aedes aegypti* is of utmost importance to minimize or eliminate the cases of the disease. An alternative for the control of this vector is the use of biological control agents such as *Bacillus thuringiensis*, which is toxic to this insect order of epidemiological importance. In this study, we sought to investigate the biological control of *A. aegypti*, with the use of *B. thuringiensis* isolated from Cerrado Maranhense. Selective bioassays were conducted to determine the entomopathogenic activity against the larvae of *A. aegypti*, quantitative bioassays in order to determine the toxicity of isolates, by means of the estimation of Median Lethal Concentration (LC<sub>50</sub>) and PCR tests (Polymerase Chain Reaction) to verify the presence of mosquitocidal genes (*cry* and *cyt*). From 45 soil samples collected in 17 counties in the State, it was obtained 1225 bacterial colonies, with 383 (31.26%) identified as *B. thuringiensis*. Of the 383 isolates tested, 12 (3.13%) showed larvicidal activity greater than 50% (BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 131, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 401, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 and BtMA 560), which were selected for subsequent realization of the quantitative bioassay and molecular characterization. The quantitative bioassays allowed to observe that the lower LC<sub>50</sub> values were obtained with the isolate 401 ( $4.0 \times 10^4$  spore-crystals/mL) and with the standard bacteria *Bti* ( $0.32 \times 10^7$  spore-crystals/mL). The others tested isolates showed low larvicidal activity. The PCR analysis showed that from eight tested genes: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* and *cyt2Aa*, five of them: *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* and *cyt2Aa* were detected in ten isolates, being absent in only two of 12 isolates tested. These data demonstrate that the isolates of *B. thuringiensis* from Cerrado Maranhense showed high pathogenicity and potential for biological control of *A. aegypti*.

Keywords: Dengue, Vector, *Bacillus thuringiensis*, Biological control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Fases de vida do *Aedes aegypti*: (A) ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto.....18
- Figura 2-** Micrografia eletrônica de *Bacillus thuringiensis* em final de esporulação, mostrando o esporo (estrutura ovoide-preto) e o cristal bipiramidal (cinza).....21
- Figura 3-** Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* em larva de mosquito.....23
- Figura 4-** Estrutura tridimensional da toxina de *Bacillus thuringiensis*, mostrando os três domínios.....24
- Figura 5-** Municípios onde foram coletadas as amostras de solo no Estado do Maranhão, Brasil.....29
- Figura 6-** Tubo Falcon e espátula utilizados na coleta das amostras de solo.....29
- Figura 7-** Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório para realização de bioensaios: A) ovos; B) bacia com ovos para eclosão das larvas; C) larvas; D) pupas; E) gaiola de manutenção dos adultos.....33
- Figura 8-** Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Aedes aegypti* durante a realização dos bioensaios seletivos.....34
- Figura 9-** Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Aedes aegypti* durante a realização dos bioensaios quantitativos.....35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Relação dos municípios, e georreferenciamento das amostras de solo utilizadas no isolamento de *Bacillus thuringiensis*.....30
- Tabela 2-** Primers utilizados na reação de PCR dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis* com ação específica para *Aedes aegypti*, com suas respectivas sequências, tamanho de fragmento esperado e temperatura de anelamento.....37
- Tabela 3-** Reagentes utilizados nas reações de amplificação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa* de *Bacillus thuringiensis*.....37
- Tabela 4-** Condições de amplificação dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis* durante a reação de PCR.....38
- Tabela 5-** Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos a partir de amostra de solo de diversos municípios do Cerrado Maranhense.....40
- Tabela 6-** Bioensaios seletivos com isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense para larvas de *Aedes aegypti*.....44
- Tabela 7-** Mortalidade em percentagem por dose das larvas de *Aedes aegypti* nos bioensaios quantitativos com os isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense nos intervalos de leitura 24 e 48 horas.....47
- Tabela 8-** Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Aedes aegypti* após 48 horas de aplicação.....48
- Tabela 9-** Genes detectados nos isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense que apresentaram mortalidade superior a 50% para larvas de *Aedes aegypti*.....49

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Bt - *Bacillus thuringiensis*

Bti - *Bacillus thuringiensis israelensis*

BtMA - *Bacillus thuringiensis* do Maranhão

BBENMA - Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão

CaCO<sub>3</sub> - Carbonato de cálcio

CB - Colônia bacteriana

CL<sub>50</sub> - Concentração Letal Mediana

cm - centímetro

cm<sup>2</sup> - centímetros quadrado

*cry* - *crystal* (genes codificadores de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)

Cry - Crystal (Proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)

*cyt*- *cytolytic* (genes codificadores de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)

Cyt - Cytolytic (Proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*)

°C - grau Celsius

DC - Dengue Clássica

DENV - sorotipo viral da dengue

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FeSO<sub>4</sub> - Sulfato de ferro

FHD - Febre Hemorrágica da Dengue

FW – Forward

GPS - Global Positioning System

H<sub>2</sub>O - óxido de hidrogênio (água)

Kb - quilobase=1000 pares de bases

MDa - Megadaltons

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

MgSO<sub>4</sub> - Sulfato de magnésio

MnSO<sub>4</sub> - Sulfato de manganês

mL - mililitro

μL - microlitro

μM - micromolar

mM – Milimolar

pb - Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

rpm - Rotação por Minuto

RV - Reverse

TBE - (Tris/Borato/EDTA)

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

UFC - Unidade Formadora de Colônia

WHO - World Health Organization

ZnSO<sub>4</sub> - Sulfato de zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 Dengue.....	15
1.2 Dengue nas Américas e no Brasil.....	16
1.3 <i>Aedes aegypti</i> .....	17
1.3.1 Controle do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	19
1.3.2 Controle Biológico.....	19
1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
1.4.1 Mecanismos de ação e $\delta$ -endotoxinas.....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos.....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	28
3.1.1 Coletas de solo.....	28
3.1.2 Isolamento e identificação.....	31
3.2 Avaliação da atividade larvicida.....	32
3.2.1 Manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em insetário.....	32
3.2.2 Bioensaios.....	33
3.2.3 Bioensaios seletivos.....	33
3.2.4 Bioensaios quantitativos.....	34
3.3 Concentração Letal Mediana (CL <sub>50</sub> ).....	35
3.4 Caracterização molecular.....	35
3.4.1 Caracterização gênica.....	35
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	39
4.2 Bioensaios seletivos.....	43
4.3 Bioensaios quantitativos.....	46
4.4 Concentração Letal Mediana (CL <sub>50</sub> ).....	48
4.5 Caracterização molecular.....	49
4.5.1 Caracterização gênica.....	49
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1 Isolamento e seleção de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	50
5.2 Bioensaios quantitativos (CL <sub>50</sub> ).....	52
5.3 Caracterização molecular.....	53

<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES.....	67
1. Primeiro Artigo científico.....	68
1.1 Periódico e classificação na WebQualis da CAPES na área de avaliação Medicina II.....	68
1.2 Normas Editoriais/Normas para os autores.....	68
1.3 Artigo propriamente dito.....	72
2. Segundo Artigo científico.....	89
2.1 Periódico e classificação na WebQualis da CAPES na área de avaliação Medicina II.....	89
2.2 Normas Editoriais/Normas para os autores.....	89
2.3 Artigo propriamente dito.....	93



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dengue

A dengue tornou-se um dos principais problemas de saúde pública não somente no Brasil, mas também em diversos países do mundo, sendo a segunda arbovirose mais importante em relação ao número de pessoas infectadas (GUBLER et al., 2001; WHO, 2013). É endêmica em mais de 100 países na África, nas Américas, no Leste do Mediterrâneo, no Sul e Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico (SAMPAIO, 2010).

Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos e áreas onde os vírus da dengue podem ser transmitidos. Até 50 milhões de infecções ocorrem anualmente com 500.000 casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (WHO, 2013).

A dengue é uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico é um vírus pertencente à família Flaviviridae, gênero Flavivirus. São conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue causador da forma clássica da doença: DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV-4 (FORATINNI, 2002; ROCHA; TAUILL, 2009). Existe ainda um elevado potencial para casos de letalidade por complicações da dengue clássica, ou seja, o surgimento da forma clinicamente mais complicada, a dengue hemorrágica (WHO, 2009).

Entretanto no ano de 2013 foi anunciada a descoberta de um novo sorotipo do vírus da dengue a partir de amostras coletadas durante um surto da doença em 2007 no continente Asiático, confirmando assim a existência oficial de cinco tipos de dengue. Mas, este até o momento só foi encontrado na Malásia (NORMILE, 2013).

Todos os sorotipos do vírus podem conduzir aos diversos tipos de dengue, que podem ser de evolução benigna em sua forma clássica (DC) (sintomática ou assintomática), e grave quando se apresenta na forma hemorrágica (FHD). A infecção por um dos vírus confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três (BRASIL, 2001a; FREITAS, 2011).

O aumento de ocorrência da dengue tem se constituído em um crescente objeto de preocupação para a sociedade e, em especial, para as autoridades de saúde, em razão das dificuldades enfrentadas para o controle das epidemias e pela necessidade de ampliação dos serviços de saúde para atendimento aos indivíduos acometidos com formas graves, em especial a FHD (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

## 1.2 Dengue nas Américas e no Brasil

A dengue tem sido relatada nas Américas há mais de 200 anos. Na década de 50, a Febre Hemorrágica da Dengue foi descrita, pela primeira vez, nas Filipinas e Tailândia. Após a década de 60, a circulação do vírus da dengue intensificou-se nas Américas. A partir de 1963, houve circulação comprovada dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 em vários países (BRASIL, 2002).

A proliferação nas Américas, e em particular no Brasil, tem múltiplos condicionantes. O fluxo rural-urbano intenso nos últimos trinta anos resultou numa concentração populacional muito elevada nas grandes cidades. As cidades, pressionadas por essa demanda, não conseguiram oferecer condições satisfatórias de habitação e de saneamento básico a uma fração importante dos seus habitantes. Em torno de 20% dos habitantes vivem em favelas, invasões, mocambos ou cortiços, onde, quando existem, o abastecimento de água e a coleta de dejetos, são irregulares. Essa situação de ocupação desordenada de grandes e médias cidades é extremamente favorável ao surgimento de dengue, pois propiciam o desenvolvimento do seu vetor (TAUIL, 2002; TEXEIRA et al., 2009).

A primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista - Roraima, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. A partir de 1986, ocorreram epidemias, atingindo o Rio de Janeiro e algumas capitais da região Nordeste (BRASIL, 2005). Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes (BRASIL, 2002).

O vírus da dengue é transmitido ao homem através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* as duas espécies mais importantes como vetor. O *A. aegypti* é o principal, e talvez, o único vetor nas Américas, enquanto que *A. albopictus* é vetor secundário na Ásia e no Pacífico (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; GUBLER et al., 2001).

Durante toda a década de 90 o *A. aegypti* estava amplamente disperso em todo território nacional refletindo no aumento significativo da incidência da dengue (BRAGA; VALLE, 2007a). A presença do vetor, associada à mobilidade da população, levou à disseminação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 para 20 dos 27 estados do país sendo registradas várias epidemias (BRASIL, 2005; CAPRARA et al., 2009; DANTÉS; WILLOQUET, 2009; TEIXEIRA et al., 2009).

Em 2000, foi pela primeira vez identificada a circulação do sorotipo DENV-3 no estado do Rio de Janeiro e em 2002, foi registrada a maior incidência de epidemia da dengue da história do país, quando foram notificados aproximadamente 790 mil casos. Houve uma rápida dispersão do sorotipo DENV-3 para outros estados do Brasil, e em 2004, verificou-se a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus do dengue (CÂMARA et al., 2007; BRASIL, 2005).

Em 2010, o DENV-4 foi isolado a partir de casos detectados no Estado de Roraima e no Amazonas. Em janeiro de 2011, foi isolado no Pará e, em março do mesmo ano, os primeiros casos de DENV-4 no Rio de Janeiro foram confirmados pelo Instituto Oswaldo Cruz (BARTH, 2013). Segundo o Ministério da Saúde de janeiro a março de 2013, os sorotipos do vírus da dengue estavam presentes praticamente em todos os Estados brasileiros (BRASIL, 2013).

Dados do Ministério da Saúde apontam que, em 2015 foram registrados 224.101 casos notificados de dengue no país até a primeira semana de março. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (145.020 casos; 64,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (34.125 casos; 15,2%), Nordeste (21.472 casos; 9,6%), Norte (12.001 casos; 5,4%) e Sul (11.483 casos; 5,1%) (BRASIL, 2015).

No estado do Maranhão, verifica-se aumento do número de casos de dengue a cada ano e a circulação de vários sorotipos virais. As primeiras epidemias ocorreram na década de 1990 com registro anual de mais de quatro mil casos, a partir de então, sempre mostrou número elevado de notificações (BRASIL, 2006, 2008, 2013).

Até o momento no ano de 2015, o Maranhão teve um aumento de quase o triplo no número de casos confirmados de dengue. Os dados analisados correspondem a um levantamento feito nos primeiros dois meses do ano, e comparados ao ano de 2014. Segundo o levantamento, neste mesmo período foram registrados 916 casos da doença, enquanto que, no ano de 2014 eram 390 casos confirmados de dengue no estado (BRASIL, 2015).

### **1.3 *Aedes aegypti***

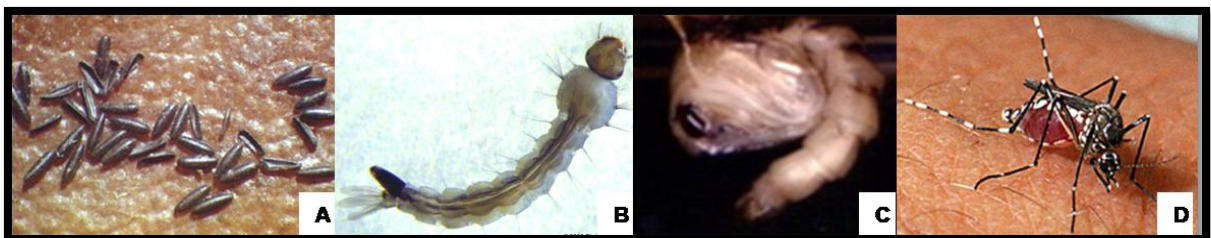
O *A. aegypti* é o principal vetor da dengue no Brasil e nas Américas. Este mosquito pertence à ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, subgênero *Stegomyia* e gênero *Aedes* (Meigen, 1818), espécie *A. aegypti* (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Este vetor é oriundo do velho Mundo e hoje é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente entre os paralelos (latitudes) 45°N e 35°S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20°C (BRASIL, 2001a).

O *A. aegypti* apresenta desenvolvimento completo, sendo que seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1). Seu ciclo de vida é curto, varia de 8 a 12 dias em regiões tropicais. Os adultos são essencialmente urbanos, as fêmeas são antropofílicas, após o ato de acasalamento realizam o repasto sanguíneo, preferencialmente em humanos, o que é necessário para maturação de seus ovos.

Posteriormente, as fêmeas repousam e ao final da digestão procuram recipientes com água para oviposição. Os ovos são depositados isoladamente nas paredes internas de recipientes artificiais como: tonéis, caixas d' água, descartáveis, vasos, pneus, e outros depósitos (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; SILVA; SILVA, 1999; TAUIL, 2002; PINHEIRO; TADEI, 2002, PINHEIRO, 2005).

As condições climáticas, aliada a fatores como: facilidade de reprodução, desenvolvimento dos meios de transporte; grande oferta de recipientes artificiais com água; aumento do uso de descartáveis; concentração populacional em médias e grandes cidades; problemas de abastecimento de água; aliados à capacidade de resistência dos ovos a dessecação, favorecem a sobrevivência do *A. aegypti* no Brasil, sendo que atualmente encontra-se espalhado em todas as unidades federadas do país (TAUIL, 2002; PINHEIRO, 2005; BRASIL, 2010).



**Figura 1-** Fases de vida do *Aedes aegypti*: (A) ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto. Fonte: NOCHT, B. (ovos); RUSSEL, R. C. (larva); STICH, A. (pupa); VIEIRA, G. J. (adulto).

### 1.3.1 Controle da dengue no Brasil

Desde a década de 20, o controle da dengue é realizado pela eliminação dos estágios imaturos (larvas) do *A. aegypti* por meio da eliminação dos criadouros ou da utilização do larvicida químico. Tem sido utilizados produtos com princípios ativos organoclorados, organofosforados, Carbamatos e mais recentemente piretróides (CAMARGO et al., 1998; OLIVEIRA, 1998; RÊBELO et al., 1999; CARVALHO et al., 2004; QUIMBAYO et al., 2014).

Os inseticidas químicos citados acima apresentam desvantagens e restrições de uso bem conhecidas: são tóxicos ao homem, causam desequilíbrio nos ecossistemas em que são utilizados, por atuarem em insetos benéficos, e quando são intensivamente utilizados podem promover a seleção de populações de mosquitos resistentes (VILARINHOS et al., 1998; BRAGA; VALLE, 2007a).

A evolução mundial da resistência de mosquitos a inseticidas químicos representa um grande desafio para a saúde pública, e o futuro do controle de vetores depende em grande parte do desenvolvimento de inseticidas biológicos, com a expectativa de que as populações já resistentes a substâncias químicas não se tornem prontamente resistentes a inseticidas biológicos (DESPRÉS et al., 2014). Diante disso, há a necessidade de busca de novas estratégias mais eficazes e ecologicamente seguras, como alternativas para o controle de *A. aegypti* no país.

### 1.3.2 Controle Biológico

O controle biológico pode ser definido como a medida que visa a redução da densidade populacional de determinado vetor, pela influência de outra população que possa agir nesse sentido. Os inimigos naturais podem ser considerados de acordo com sua maneira de ação, isto é, se a da predação ou do parasitismo. Este, por sua vez, poderá ser focalizado como micro ou como macroparasitismo, de acordo com o critério determinado pelo fato de, respectivamente, os agentes se reproduzirem ou não no organismo do hospedeiro (FORATTINI, 2002).

Várias pesquisas estão sendo realizadas na busca por alternativas biológicas para o controle de *A. aegypti*. A utilização de espécies predadoras (peixes larvófagos, copépodos), que atuam comendo as larvas em reservatórios aquáticos, está entre um dos mais antigos sistemas de controle biológico de mosquitos (BRASIL, 2001b; PAMPLONA et al., 2004; PAMPLONA et al., 2007).

Como controle biológico de *A. aegypti*, além da utilização de peixes na predação das larvas (BRASIL, 2001b; PAMPLONA et al., 2004) cita-se: extratos botânicos (CAVALCANTI et al., 2004; SIMAS et al., 2004; COSTA et al., 2005; GERIS et al., 2008; LEITE et al., 2009); fungos (HABIB, 1989); e nemátodos (BRAGA; VALLE, 2007b).

A tendência atual é de restringir o uso de inseticidas químicos, em substituição, incentiva-se o uso de controle biológico e o manejo ambiental (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2003; PAMPLONA et al., 2004; GUO et al., 2015). As bactérias entomopatogênicas formadoras de esporos possuem um grande potencial para o controle biológico de insetos. A presença de esporos lhe confere resistência às condições adversas ambientais, conferindo-las facilidade de produção em larga escala industrial (HABIB; ANDRADE, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Dentre os agentes de controle biológico, as bactérias são uma alternativa econômica e ecologicamente viável (PRAÇA et al., 2004). O uso de bactérias para o controle das larvas de mosquitos tem-se destacado entre diversos componentes que devem fazer parte dos programas de manejo integrado (VILARINHOS et al., 1998).

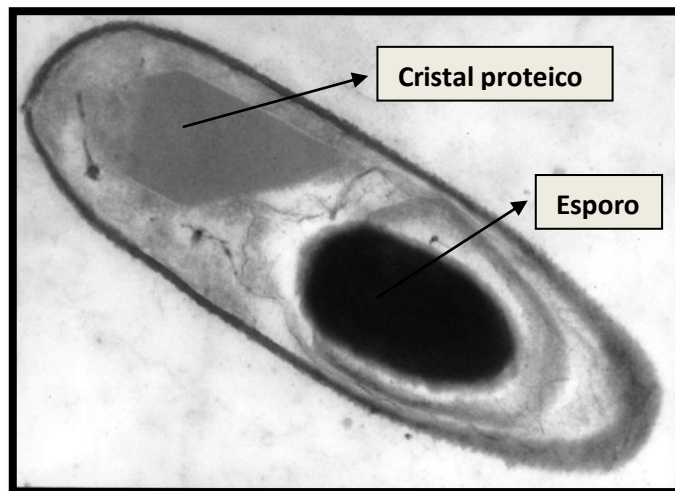
Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos são poucas aquelas que podem ser utilizadas no controle biológico de vetores de doenças tropicais. Dentre estas, podemos destacar *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de várias ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (CAVADOS et al., 2001; DE MAAGD et al., 2003).

#### **1.4 *Bacillus thuringiensis***

Morfologicamente, *B. thuringiensis* é um bastonete de 1 a 1,2 µm de largura por 3 a 5 µm de comprimento, geralmente com motilidade. É uma bactéria gram-positiva, aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 45°C. Formam esporos, entre elípticos e cilíndricos, em posição central, com esporângio não nitidamente estendido (Figura 2) (ALVES, 1998; COPALBO et al., 2005).

Esta espécie foi primeiramente observada em 1901 por Ishiwata, causando mortalidade em larvas de bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Linnaeus, 1758), sendo inicialmente chamada de *Bacillus sotto*. Mais tarde em 1911, Berliner isolou novamente este bacilo, descrevendo aspectos da sua patogenicidade e denominou-o de *B. thuringiensis* em homenagem a província da Thuringia na Alemanha, local onde foi primeiramente encontrado (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

O *B. thuringiensis* ocorre em diversos ambientes: como solo, folhas de plantas e algumas vezes em micro habitats favoráveis como, por exemplo, dentro de insetos mortos. O número de células de *B. thuringiensis* obtidas em isolamento pode variar entre  $10^2$  e  $10^4$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, enquanto que em plantas este número varia entre 0 e 100 UFC/cm<sup>2</sup> de folha (DAMGAARD, 2000).



**Figura 2-** Micrografia eletrônica de *Bacillus thuringiensis* em final de esporulação, mostrando o esporo (estrutura ovoide-preto) e o cristal bipiramidal (cinza). Fonte: SANCHIS, V. (2010), adaptado por: LOBO, K. S. (2014).

Dentre as bactérias entomopatogênicas, *B. thuringiensis* constitui-se como componente ativo utilizado comercialmente nos biopesticidas. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* é a variedade que apresenta maior toxicidade para culicídeos e é utilizada como estirpe padrão, sendo recomendada para o controle de mosquitos em várias regiões do mundo. O sucesso desta bactéria como agente de controle biológico é devido à produção durante a esporulação de um cristal protéico, no qual contêm toxinas inseticidas, comumente chamadas de  $\delta$ -endotoxinas (AGAISSE; LERECLUS, 1995; DELÉCLUSE et al., 2000; SARASWATHY; KUMAR, 2004).

O *B. thuringiensis* apresenta uma série de vantagens tais como: segurança ambiental, pois atua somente nos indivíduos alvos e as suas toxinas não se acumulam no ambiente; boa duração no ambiente, suas formulações comerciais podem apresentar eficácia no campo de até 90 dias em locais protegidos dos raios ultravioletas; capacidade de se reciclar em larvas mortas; ou seja, os esporos podem germinar dentro do cadáver das larvas, desta forma, mantendo-se no ambiente; além disso, apresenta diversidade de toxinas, o que dificulta a

seleção de mosquitos resistentes (HABIB; ANDRADE, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003).

#### **1.4.1 Mecanismo de ação e $\delta$ -endotoxinas**

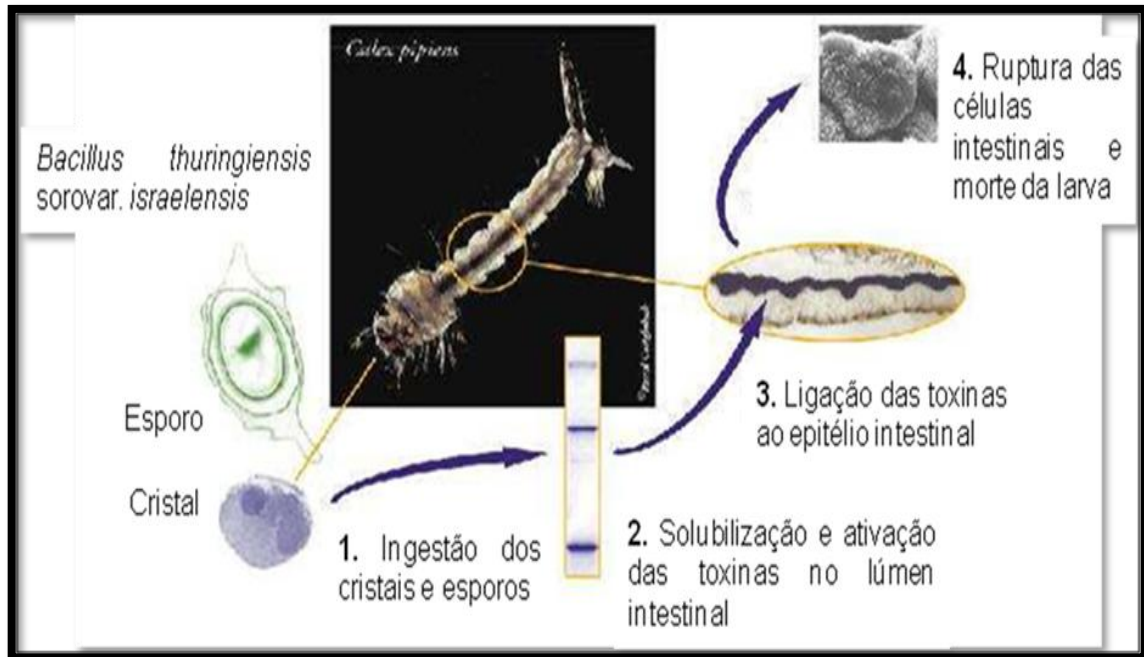
A propriedade larvicida de *B. thuringiensis* é atribuída à produção de um cristal proteico, que contém  $\delta$ -endotoxinas, sendo as proteínas do Cristal - Cry as mais relevantes, e as Citolíticas - Cyt que atuam sinergeticamente com as toxinas do cristal. Estas proteínas são sintetizadas sob condições restritas de crescimento, durante o processo de esporulação da bactéria e são codificadas por diferentes genes denominados genes *cry* e *cyt* (AGAISSE; LERECLUS, 1995; DE MAAGD et al., 2003; SARASWATHY, KUMAR, 2004).

O cristal proteico de *B. thuringiensis* é considerado uma pró-toxina, ou seja, uma forma não ativa e somente quando em contato com meio alcalino ou em solução de enzima proteolítica, ocorre o processo de clivagem da pró-toxina, resultando em moléculas de tamanhos variados, as  $\delta$ -endotoxinas (KUO; CHAK, 1996; YAMAMOTO; BRAVO et al., 2005; ZONG et al., 2007). Os esporos também podem contribuir com a patogenicidade através da ação sinérgica realizada juntamente com as  $\delta$ -endotoxinas (JOHNSON; McGAUGHEY, 1996).

Essas proteínas tornam-se tóxicas para os insetos, quando as larvas ingerem esses cristais. Assim, após a ingestão, os cristais são solubilizados no pH alcalino, que em presença de enzimas digestivas, são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos ( $\delta$ -endotoxinas). As toxinas hidrolisadas cruzam através da membrana peritrófica, ligam-se aos receptores específicos na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico das células da membrana, formando poros, causando lise na célula e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. Conseqüentemente, a larva infectada morre por inanição, uma vez que torna-se incapaz de absorver os nutrientes (Figura 3) (HÖFTE; WHITELEY, 1989; BRAVO, 1997; COPPING; MENN, 2000).

A atividade entomopatogênica desta bactéria está associada com a síntese destas proteínas que são altamente tóxicas e específicas para insetos de várias ordens e outros invertebrados (HÖFTE; WITELEY, 1989; GLARE; O'CALLANGHAM, 2000).

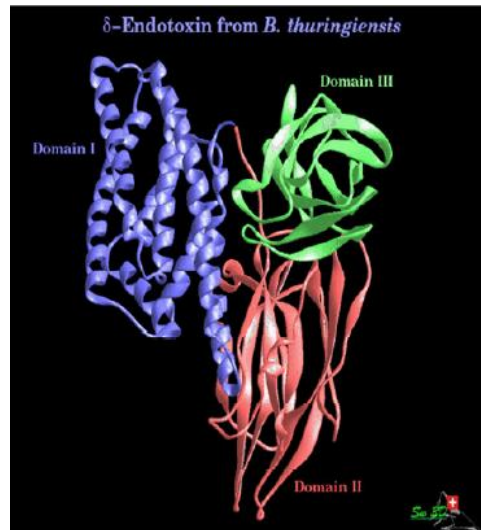




**Figura 3-** Representação esquemática do modo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis* em larva de mosquito. Fonte: Modificado de REGIS, L. et al. (2001).

Várias ordens de insetos possuem susceptibilidade as linhagens de *B. thuringiensis*, dentre as mais estudadas estão, Lepidoptera, Coleoptera por constituírem importantes pragas agrícolas e Diptera, principalmente os transmissores de doença. Além de insetos citam-se ainda nematóides, ácaros entre outros organismos (KUO; CHAK, 1996; YAMAMOTO; DEAN, 2000; DE MAAGD et al., 2003; VAN FRANKENHUYZEN, 2009).

As toxinas de *B. thuringiensis* são formadas por três domínios, I estaria relacionado á inserção e formação de poros na membrana; o domínio II é responsável pelo reconhecimento do receptor e, portanto, pela especificidade da toxina para o inseto-alvo; a função do domínio III ainda não está totalmente elucidada, porém acredita-se que esta região da proteína parece estar envolvida com ambas as funções dos domínios I e II, além da estabilidade da toxina (Figura 4) (SARASWATHY; KUMAR, 2004).



**Figura 4-** Estrutura tridimensional da toxina de *Bacillus thuringiensis*, mostrando os três domínios. Fonte: [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/custodio/Bt\\_delta\\_endotoxina.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/custodio/Bt_delta_endotoxina.htm).

Estudos sobre a toxina de *B. thuringiensis*, mostra a agregação e interação dos três domínios para causar a atividade larvicida de *B. thuringiensis*. Saraswathy e Kumar (2004) descreveram a engenharia das diferentes  $\delta$ -endotoxinas o que levou a uma compreensão do seu modo molecular de ação e construção de novas toxinas com maior atividade larvicida e especificidade. A toxicidade das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

A composição da inclusão cristalina e as estruturas das toxinas determinam a forma do cristal, podendo ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou ainda sem forma definida (HABID; ANDRADE, 1998).

A maior parte das cepas de *B. thuringiensis* são capazes de produzir mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry e/ou Cyt, como ocorre, por exemplo, em *B. thuringiensis* subesp. *israelenses* (*Bti*), que apresenta 5 genes codificadores de proteínas Cry e um outro gene que codifica uma Cyt, todos localizados em um mesmo plasmídeo com massa molecular de 72 MDa (GONZALEZ; CARLTON, 1984; LERECLUS et al., 1989). Os genes das proteínas do cristal protéico de *B. thuringiensis* estão presentes em plasmídeos conjugativos, este tipo de organização, facilita a recombinação e troca destes elementos, fornecendo um importante mecanismo de geração de novas

especificidades (ARONSON, 1993). Esses dados mostram a importância da verificação da presença desses genes em linhagens com ação para *A. aegypti*.

As variedades de proteínas Cry e Cyt são o resultado de um contínuo esforço na busca por toxinas com propriedades adequadas para o controle de insetos de importância agrícola e vetores de doenças (PIGOTT; ELLAR, 2007). Estas toxinas compreendem mais de 400 genes cry e aproximadamente 37 genes cyt já foram identificados. As proteínas Cry estão classificadas em cerca de 72 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de existirem 3 grupos de toxinas Cyt (CRICKMORE, 2014). As toxinas Cry especificamente com ação para dípteros vetores de doenças abrangem cerca de 20, sendo que continuamente são descritos novos genes e, conseqüentemente, novas toxinas (VAN FRANKENHUYZEN, 2009).

Como exemplo da importância do esforço de trabalhos de isolamento constante e avaliação larvicida de novos isolados de *B. thuringiensis*, em 2009, na China foi isolada do solo uma nova linhagem de Bt, que mostrou atividade larvicida contra *A. aegypti* vinculada a esta descoberta, encontrou-se uma nova proteína Cry diferente das atualmente conhecidas com ação para este vetor (TAN et al., 2009).

Principalmente, devido ao crescente uso das proteínas Cry e Cyt, produzidas por essa bactéria no controle de insetos de importância epidemiológica. Existe também a preocupação com manejo de resistências de espécies alvo às  $\delta$ -endotoxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* já conhecidas. E como essas toxinas não apresentam risco à saúde humana e outros mamíferos a sua utilização para controle de insetos tornam-se interessante (CAROZZI et al., 2001; SILVA, 2008).

Com isso, a busca de novas linhagens de *B. thuringiensis* com potencialidades diferentes das atualmente conhecidas, apresenta-se como uma das prioridades nos projetos de pesquisa em diversas regiões do mundo (SCHNEPF; WHITELEY, 1981; BARRETO, 2005). Com o objetivo de obter, isolar e caracterizar linhagens promissoras e com toxinas diferentes das já existentes, e que possam ser utilizadas na produção de biopesticidas (MEDEIROS et al., 2006).

Tendo em vista, a importância epidemiológica de *A. aegypti* como principal vetor da dengue, e que *B. thuringiensis* proporciona letalidade às larvas, é necessário isolar novas linhagens mais promissoras para o controle desse vetor, em diferentes regiões, na tentativa de encontrar distintos espectros de ação (SILVA, 2008).

Considerando ainda que o estado do Maranhão está localizado na área de transição entre a região amazônica e o semi-árido nordestino (GEPLAN, 2002). Desta forma, possuindo uma diversidade de ecossistemas, como o Cerrado, que constitui cerca de 65% do território do Estado, o que certamente favorece a biodiversidade de microorganismos, fato que fortalece a realização dessa pesquisa.

Aliado a isso, considerando-se que existem poucas pesquisas no Estado do Maranhão sobre a diversidade de *B. thuringiensis*, propôs-se a realização deste trabalho com intuito de buscar isolados de Bt do solo com poder de toxicidade para o *A. aegypti* e conseqüentemente que possam ser utilizadas no controle do vetor da dengue no Estado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- ✓ Investigar o potencial de isolados de *B. thuringiensis* do cerrado Maranhense, enquanto agente de controle biológico de *A. aegypti*.

### 2.2 Específicos

- ✓ Montar um banco de *B. thuringiensis* isolados de diversas localidades do cerrado Maranhense, relacionando linhagens com ação entomopatogênica;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida de isolados do cerrado Maranhense em condições de laboratório, com a determinação da Concentração Letal Mediana – CL<sub>50</sub>;
- ✓ Realizar a caracterização molecular de isolados de *B. thuringiensis* do cerrado Maranhense com toxicidade em *A. aegypti*.

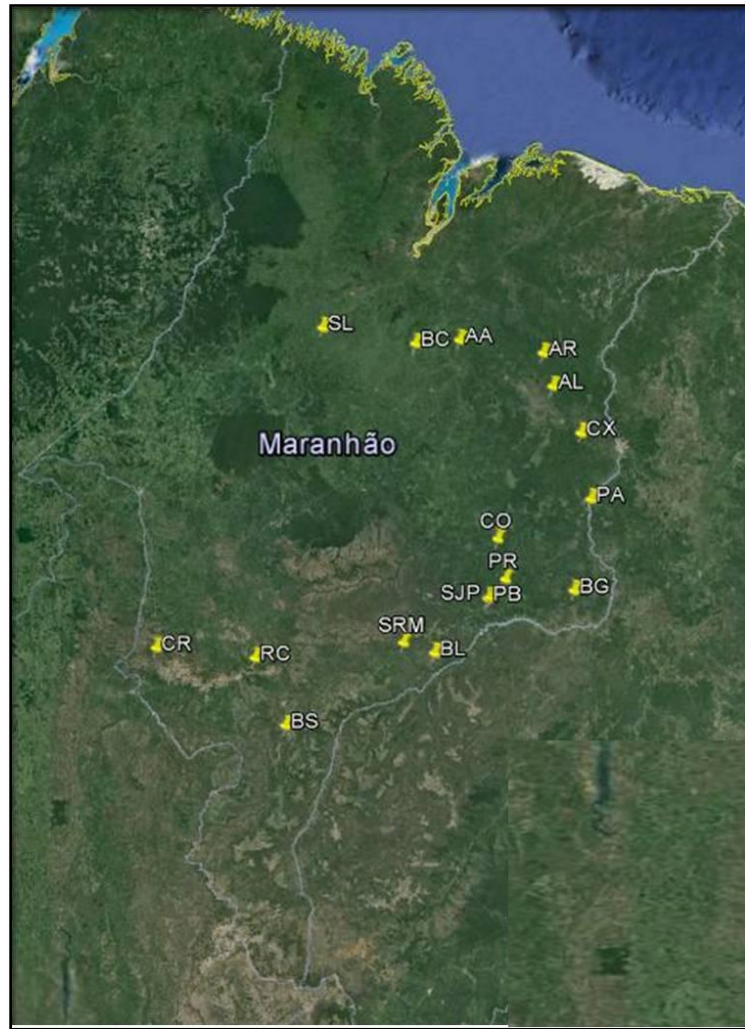
### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento de *Bacillus thuringiensis***

##### **3.1.1 Coletas de solo**

O isolamento de *B. thuringiensis* foi realizado a partir de coletas de amostras de solo, oriundas de 17 municípios do Cerrado Maranhense, escolhidos aleatoriamente: Caxias (CX), Aldeias Altas (AL), Arari (AR), Santa Luzia (SL), Bacabal (BC), Alto Alegre do Maranhão (AA), Parnarama (PA), Colinas (CO), Paraibano (PR), São João dos Patos (SJP), Barão de Grajaú (BG), Pastos Bons (PB), Benedito Leite (BL), São Raimundo das Mangabeiras (SRM), Balsas (BS), Riachão (RC) e Carolina (CR) (Figura 5). Os pontos de coleta das amostras foram georreferenciados por meio de aparelho GPS (Global Positioning System).

As amostras foram coletadas com auxílio de espátula de madeira e acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL ambos estéreis, sendo coletados solos de coloração escura, a uma profundidade de até 10 cm do nível do solo (Figura 6). O material foi acondicionado em caixa de isopor em condições ambientais e transportado ao Laboratório de Entomologia Médica - LABEM do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA, as quais foram devidamente identificadas para posterior isolamento e identificação de Bt (Tabela 1).



**Figura 5-** Municípios onde foram coletadas as amostras de solo no Estado do Maranhão, Brasil. Fonte: Google Earth, Adaptado por LOBO, K. S. (2014).



**Figura 6-** Tubo Falcon e espátula utilizados na coleta das amostras de solo. Foto: MADEIRA, RTP (2013).

**Tabela 1-** Relação dos municípios, e georreferenciamento das amostras de solo utilizadas no isolamento de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Georreferenciamento</b>
1	Caxias	-04°53283 S -043°24539 W
2	Caxias	-04°53293 S -043°24542 W
3	Caxias	-04°54100 S -043°25444 W
4	Caxias	-04°54104 S -043°25454 W
5	Caxias	-04°53027 S -043°22518 W
6	Caxias	-04°53018 S -043°22520 W
7	Caxias	-04°54561 S -043°21243 W
8	Caxias	-04°54567 S -043°21236 W
9	Caxias	-04°54564 S -043°21225 W
10	Caxias	-04°48133 S -043°20352 W
11	Caxias	-04°48117 S -043°20343 W
12	Aldeias Altas	-04°38364 S -043°28061 W
13	Aldeias Altas	-04°38367 S -043°28062 W
52	Arari	-03°50820 S -044°75913 W
53	Arari	-03°50822 S -044°75903 W
54	Santa Luzia	-04°72777 S -046°20900 W
55	Santa Luzia	-04°38205 S -046°23301 W
66	Bacabal	-04°21350 S -044°64569 W
67	Bacabal	-04°21350 S -044°64569 W
68	Alto Alegre do MA	-04°24027 S -044°43914 W
69	Alto Alegre do MA	-04°24027 S -044°43914 W
73	Parnarama	-5°395049 S -43°011988 W
115	Colinas	-06°04564 S -044°24599 W
116	Colinas	-06°04576 S -044°24602 W
117	Colinas	-06°04535 S -044°23106 W
118	Paraibano	-06°40370 S -043°99750 W
119	Paraibano	-06°40361 S -043°99727 W
120	São João dos Patos	-06°50375 S -043°68658 W
121	São João dos Patos	-06°49528 S -043°68339 W
122	São João dos Patos	-06°49523 S -043°68343 W
123	Barão de Grajaú	-06°75633 S -043°03584 W
124	Barão de Grajaú	-06°75600 S -043°00500 W
125	Pastos Bons	-06°60343 S -044°07106 W
126	Benedito Leite	-07°22555 S -044°55972 W
127	Benedito Leite	-07°21075 S -044°55723 W
128	São Raimundo das Mangabeiras	-07°00805 S -045°47686 W
129	São Raimundo das Mangabeiras	-07°03734 S -045°50122 W
130	Balsas	-07°53533 S -046°03911 W
131	Balsas	-07°53833 S -046°03878 W
132	Riachão	-07°34900 S -046°60464 W
133	Riachão	-07°37117 S -046°63114 W
134	Carolina	-07°34641 S -047°44468 W
135	Carolina	-07°32949 S -047°45271 W
136	Carolina	-07°41508 S -047°21445 W
137	Carolina	-07°41665 S -047°21482 W



### 3.1.2 Isolamento e identificação

O isolamento das linhagens de *B. thuringiensis* foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica - LABEM do Centro de Estudos Superiores de Caxias – CESC/UEMA. Os procedimentos para o isolamento de *B. thuringiensis* seguiram os métodos descritos por Polanczyk (2004), o qual é uma modificação do método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1985). Este procedimento consistiu em misturar 1g de solo à 10 mL de solução de sais (0,006 mM FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 mM CaCO<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,08 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,07 mM MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,006 mM ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O).

Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente em solução salina a 1%. Uma alíquota de 1mL da solução foi homogeneizada e submetida a choque térmico de 80°C por 12 minutos e em gelo por 5 minutos. Posteriormente, 100 µL da solução foi transferida para placas de Petri contendo ágar nutriente, sendo posteriormente espalhadas na placa com auxílio de uma alça de Drigalski estéril. As placas foram invertidas e armazenadas para o crescimento das colônias em estufa bacteriológica a 28°C, durante 48 horas.

Após o crescimento, as colônias foram avaliadas quanto à morfologia: elevação, forma, estrutura e borda. As colônias que apresentaram características típicas de *Bacillus spp.* foram inoculadas em caldo nutriente, contendo penicilina G, servindo assim como meio seletivo, e colocadas em incubador rotativo a 28°C a 180 rpm por cerca de 48 horas.

As colônias crescidas no meio com antibiótico foram observadas a fresco em microscópio de contraste de fase (aumento 100x), para verificar a presença de inclusão parasporais (cristais de proteínas). Os isolados que apresentaram cristal foram identificados como *B. thuringiensis* e, posteriormente, depositadas no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - BBENMA, no LABEM do CESC/UEMA.

Os isolados possuem código, formado de letras e números, e são nomeados de acordo com o BBENMA, BtMA: Bt – *Bacillus thuringiensis* e MA – Maranhão (*Bacillus thuringiensis* do Maranhão), seguido do número de identificação do isolamento. E como linhagem padrão foi utilizada uma estirpe de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

## 3.2 Avaliação da atividade larvicida

### 3.2.1 Manutenção de *Aedes aegypti* em insetário

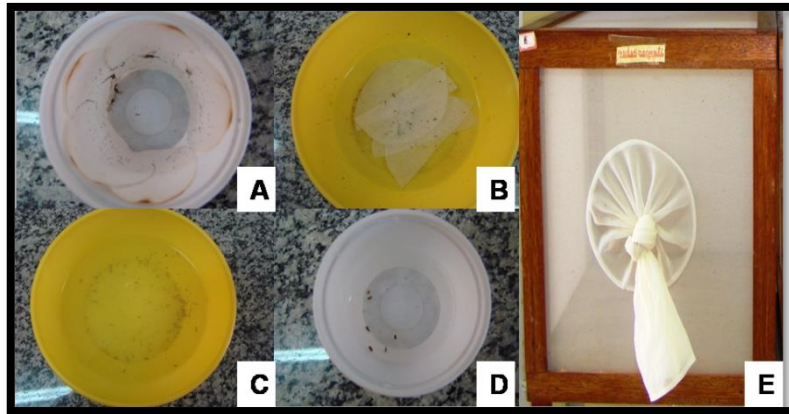
Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* que foram obtidas da colônia mantida no Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA. As larvas foram criadas sob condições de temperatura e umidade controladas, com temperatura em média de  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa a 85% e fotofase de 12 horas.

Após a eclosão dos ovos, as larvas receberam alimento constituído de ração para peixes, três vezes por semana foi realizada a limpeza das bacias plásticas, com a troca de 1/3 da água, para evitar a formação de película de gordura e a proliferação de microorganismos. As larvas foram mantidas nas bacias até chegar ao 3º estágio e retiradas para serem utilizadas nos experimentos.

Os exemplares não usados nos bioensaios, foram deixados na bacia até atingir o estágio de pupa, momento no qual foram levados para as gaiolas para emergência dos alados.

Na manutenção dos mosquitos adultos, fêmeas e machos, foram alimentados com solução de água e açúcar à 10%, umedecida em algodão. Para as fêmeas foi oferecido o repasto sanguíneo utilizando-se um hamster (*Mesocricetus auratus*). As fêmeas ingurgitadas foram postas para desovar em copos revestidos com papel-filtro umedecido para evitar dessecação dos ovos.

Após período de oviposição, em média de três a cinco dias, as desovas foram transferidas para bacias contendo água potável e alimento, seguindo o mesmo ciclo de atividades mencionado anteriormente (Figura 7).



**Figura 7-** Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório para realização de bioensaios: A) ovos; B) bacia com ovos para eclosão das larvas; C) larvas; D) pupas; E) gaiola de manutenção dos adultos. Fotos: Acervo do Laboratório de Entomologia Médica (LABEM).

### 3.2.2 Bioensaios

Foram realizados dois tipos de bioensaios: o bioensaio seletivo, cujo objetivo foi selecionar isolados com patogenicidade às larvas de *A. aegypti* e o bioensaio quantitativo (dose) com a finalidade de determinar a toxicidade dos isolados que mostraram atividade entomopatogênica, por meio da estimativa da Concentração Letal Mediana ( $CL_{50}$ ).

### 3.2.3 Bioensaios seletivos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA, sob temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 85%. Para cada isolado, foi preparada réplica de três copos plásticos contendo 10 mL de água destilada, 10 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* e 1 mL da cultura total do bacilo, crescido em Agar Nutriente a  $28^\circ\text{C}$  em estufa de crescimento bacteriológico, por um período de 5 dias, até ser verificada a esporulação ao microscópio óptico de contraste de fase. Em cada bioensaio, foi preparada uma réplica sem inoculação bacilar, servindo assim como controle negativo (Figura 8).

Após a aplicação do bacilo, com 24 e 48 horas, foi feita leitura de mortalidade das larvas, onde foram contados todos os indivíduos vivos e mortos, obtendo desta forma o percentual de mortalidade dos indivíduos (DULMAGE et al., 1990).

Considerou-se com atividade larvicida os isolados que apresentaram mortalidade acima de 50%, aos quais foram selecionados para posterior realização do bioensaio quantitativo e caracterização molecular.



**Figura 8-** Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Aedes aegypti* durante a realização dos bioensaios seletivos. Foto: MADEIRA, R. T. P. (2013).

### 3.2.4 Bioensaios quantitativos

Os isolados selecionados no bioensaio seletivo foram testados em bioensaios de dose para a determinação da  $CL_{50}$ . Para o preparo das suspensões de esporos/cristal, os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), foram cultivados em Placas de Petri com meio de cultura Agar Nutriente e incubados a 28°C durante 5 dias, permitindo assim a completa esporulação e liberação dos cristais.

Após este período, todo o conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubos Falcon contendo 10 mL de água destilada autoclavada e 0,01% de Triton® X-100 (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada e, a partir desta, foram feitas três suspensões seriadas, sendo  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , respectivamente.

A suspensão seriada  $10^{-2}$  foi utilizada para a contagem de esporos em microscópio óptico com auxílio da Câmara de Neubauer (ALVES; MORAES, 1998), para a padronização à concentração de  $1,0 \times 10^8$  esporos-cristal/mL, constituindo a suspensão inicial testada no bioensaio de dose e, a partir desta concentração, foram preparadas suspensões diluídas seriadamente.

Os bioensaios foram realizados distribuindo-se, com auxílio de um micropipetador, 1 mL de cada suspensão dos isolados de *B. thuringiensis*, em copos descartáveis contendo 99 mL de água destilada e 20 larvas de 3º ínstar de *A. aegypti* em cada copo, imersas com auxílio de pipetas Pasteur. O experimento foi conduzido em três repetições e, para comparação dos resultados, foi incluída a linhagem padrão (*Bti*) (controle positivo) e, copos sem a cultura bacteriana (controle negativo) (Figura 9).

Nas primeiras 24 e 48 horas após aplicação das suspensões foi realizada a contagem de larvas vivas e mortas, foram considerados mortos os indivíduos que não responderem com movimentos ao ser tocados por um palito.



**Figura 9-** Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Aedes aegypti* durante a realização dos bioensaios quantitativos. Foto: LOBO, K. S. (2014).

### 3.3 Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>)

A determinação da Concentração Letal Mediana-CL<sub>50</sub>, foi realizada por meio da análise de Probit, utilizando-se o programa POLO PLUS (LeOra Software Berkeley, C.A.), calculada a partir dos dados de mortalidade das larvas nos bioensaios de dose (FINNEY, 1981; HADDAD, 1998).

### 3.4 Caracterização molecular

Os isolados de *B. thuringiensis* do cerrado Maranhense que apresentaram mortalidade superior a 50% nos bioensaios seletivos foram caracterizados para se determinar a presença de genes *cry* e *cyt* com ação larvicida em Diptera, especificamente para *A. aegypti* conforme Cerón et al. (1995) e Bravo et al. (1998).

#### 3.4.1 Caracterização gênica

Para a detecção desses genes utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Foram pesquisados oito genes: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*, com ação tóxica para larvas de *A. aegypti*, presentes na linhagem padrão (*Bti*) e cuja descrição consta na Tabela 2.

Para a extração do DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foi utilizado o protocolo do Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad). Os isolados foram previamente cultivados em placas contendo meio Ágar Nutriente sólido, por 18h a 28°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1 mL de água estéril em tubos de microcentrífuga e levados à centrifugação por 1 min à 11.000 rpm à 20°C.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µL do Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56° C por 20 min, agitado rigorosamente em vórtex por 10 segundos e, logo após, incubado em água fervente (100°C) por 8 min. A amostra foi novamente agitada em vórtex por 10s e centrifugada a 20°C por 3 min a 11.000 rpm. Finalmente, 200 µL do sobrenadante foram colhidos e transferidos para um microtubo estéril, a qual foi estocada em freezer – 20° C até o momento do uso.

Para cada isolado de *B. thuringiensis* foi realizada teste de PCR com todos os *primers* específicos descritos na Tabela 2. Para a realização das reações de amplificação desses genes *cry* e *cyt* foram utilizados os reagentes nas concentrações discriminadas na Tabela 3. O DNA padrão *Bti* foi utilizado como controle positivo nas reações de amplificação por PCR. Como controle negativo a quantidade de DNA foi substituída por água para injeção livre de DNase, previamente esterilizada.

**Tabela 2-** Primers utilizados na reação de PCR dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis* com ação específica para *Aedes aegypti*, com suas respectivas sequências, tamanho de fragmento esperado e temperatura de anelamento.

Gene (iniciadores)	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>cry4Aa</i> *	5'- GGGTATGGCACTCAACCCCACTT 3'- GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	1529	57
<i>cry4Ba</i> *	5'- GAGAACACACCTAATCAACCAAT 3'- GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	1951	50
<i>cry10Aa</i> #	5'- ATTGTTGGAGTTAGTGCAGG 3'- AATACTTTGGATGTGTCTTGAG	995	50
<i>cry11Aa</i> *	5'- CCGAACCTACTATTGCGCCA 3'- CTCCCTGCTAGGATTCCGTC	470	50
<i>cry11Ba</i> #	5'- TACAGGATGGATAGGGAATGG 3'- TAATACTGCCATCTGTTGCTTG	608	52
<i>cyt1Aa</i> #	5'- AACTCAAACGAATAACCAAG 3'- TGTTCCCTTTACTGCTGATAC	300	53
<i>cyt1Ab</i> #	5'- AAGCAAGGGTTATTACATTACG 3'- CCAATACTAAGATCAGAGGG	698	54
<i>cyt2Aa</i> #	5'- GCATTAGGAAGACCATTTG 3'- AAGGCTAAGAGTTGATATCG	361	53

Fonte: \*Primers desenhados por Ben Dov et al. (1997);

#Primers desenhados por Costa et al. (2010).

**Tabela 3-** Reagentes utilizados nas reações de amplificação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa* de *Bacillus thuringiensis*.

Reagente	Concentração	Quantidade
Solução tampão (sem Mg)	1X	5,0 µL
MgCl <sub>2</sub>	2mM	2,0 µL
dNTPs	0,2mM	0,5 µL
Primer FW	1 µM/ µL	2,0 µL
Primer RV	1 µM/ µL	2,0 µL
Taq DNA polimerase	1 U/ µL	0,2 µL
Água para injeção	-	11,3 µL
DNA	-	2,0 µL
<b>TOTAL</b>		<b>25 µL</b>

FW: forward; RV: reverse

A reação de amplificação dos genes foi realizada em termociclador *Gencycler-G96G* (Biosystems). As condições de amplificação foram programadas de acordo com as especificações citadas na Tabela 4.

**Tabela 4-** Condições de amplificação dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis* durante a reação de PCR.

Desnaturação inicial	94°C	5min
Desnaturação	94°C	1min
Anelamento	50-57°C	30s
Polimerização	72°C	1min
Extensão final	72°C	7min
Hold	4°C	
Total de ciclos	<b>35</b>	

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo. Após a reação de amplificação, foi retirado 5µL de cada amostra e adicionado em 3µL do corante Blue/Orange Loading Dye (Promega).

As amostras foram aplicadas no gel de agarose, sendo este submetido a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA) em pH alcalino. Em cada reação de eletroforese, foi incluído 3µL de DNA Ladder 1Kb (Promega) como padrão de peso molecular, o qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados.

Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em um transiluminador ultravioleta e posteriormente foram fotografados em aparelho TCL Documentation (Vilber Lourmat).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento de *Bacillus thuringiensis*

Foram analisadas 45 amostras de solo provenientes de 17 municípios do Cerrado Maranhense. Destas, foram obtidas 1225 colônias bacterianas, sendo 383 identificadas como *B. thuringiensis*, o que corresponde a 31,26% do total. O maior número de colônias bacterianas foi encontrado nas amostras 12 e 13 de Aldeias Altas com 203 e 93 colônias, respectivamente, seguido da amostra 67 de Bacabal com 84 colônias bacterianas (Tabela 5).

O maior percentual de isolados de *B. thuringiensis* obtido por amostra coletada, ocorreu com a amostra 118, proveniente do município de Paraibano, sendo que do total de 32 colônias bacterianas obtidas, 28 (87,5%) foram identificadas como *B. thuringiensis*, seguido das amostras 120 de São João dos Patos e 130 de Balsas, com índice de 85,71% e 83,33%, respectivamente. Ressalta-se que das amostras analisadas, seis mostraram-se negativas, ou seja, não foi identificada nenhuma linhagem como Bt (Tabela 5).

Em termos quantitativos, o maior número de isolados de Bt obtidos de uma única amostra foi de 43 linhagens, proveniente da amostra 67 do município de Bacabal, seguido de 28 isolados obtidos da amostra 118 de Paraibano, e 25 da amostra 115 de Colinas (Tabela 5).

**Tabela 5-** Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos a partir de amostra de solo de diversos municípios do Cerrado Maranhense.

<b>Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Colônias bacterianas (CB)</b>	<b><i>B. thuringiensis</i> Índice de <math>Bt=n(Bt/CB)*100</math></b>	<b>Isolado</b>
1	Caxias	5	0(0%)	-
2	Caxias	44	0(0%)	-
3	Caxias	13	2(15,38%)	BtMA 01e 02
4	Caxias	4	1(25,0%)	BtMA 03
5	Caxias	21	3(14,28%)	BtMA 04, 05 e 06
6	Caxias	19	0(0%)	-
7	Caxias	22	0(0%)	-
8	Caxias	19	0(0%)	-
9	Caxias	9	0(0%)	-
10	Caxias	20	1(5%)	BtMA 07
11	Caxias	21	6(28,57%)	BtMA 08, 09, 10, 11, 12 e 13
12	Aldeias Altas	203	7(3,44%)	BtMA 14, 15,16, 17, 18, 19 e 20
13	Aldeias Altas	93	9(9,67%)	BtMA 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29
52	Arari	44	20(45,45%)	BtMA 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203 e 204
53	Arari	41	8(19,51%)	BtMA 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 e 69
54	Santa Luzia	3	1(33,33%)	BtMA 251
55	Santa Luzia	12	2(16,66%)	BtMA 178 e 179
66	Bacabal	52	11(21,15%)	BtMA 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80
67	Bacabal	84	43(51,19%)	BtMA 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 e 123
68	Alto Alegre do MA	27	6(22,22%)	BtMA 124, 125, 126, 127, 128 e 129
69	Alto Alegre do MA	5	2(40,0%)	BtMA 130 e 131
73	Parnarama	31	6(19,35%)	BtMA 252, 253, 254, 255, 256 e 257

**Tabela 5** Continuação.

115	Colinas	33	25(75,75%)	BtMA 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 360, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375 e 376
116	Colinas	28	10(35,71%)	BtMA 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385 e 386
117	Colinas	30	16(53,33%)	BtMA 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401 e 402
118	Paraibano	32	28(87,5%)	BtMA 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 e 430
119	Paraibano	24	17(70,83%)	BtMA 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446 e 447
120	São João dos Patos	28	24(85,71%)	BtMA 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470 e 471
121	São João dos Patos	20	14(70,0%)	BtMA 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, e 485
122	São João dos Patos	13	9(69,23%)	BtMA 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493 e 494
123	Barão de Grajaú	7	5(71,42%)	BtMA 495, 496, 497, 498 e 499
124	Barão de Grajaú	22	14(63,63%)	BtMA 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512 e 513
125	Pastos Bons	8	2(25%)	BtMA 514 e 515
126	Benedito Leite	33	13(39,39%)	BtMA 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527 e 528
127	Benedito Leite	27	17(62,96%)	BtMA 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, e 545
128	São Raimundo das Mangabeiras	20	5(25,0%)	BtMA 546, 547, 548, 549 e 550
129	São Raimundo das Mangabeiras	13	3(20,07%)	BtMA 551, 552 e 553
130	Balsas	24	20(83,33%)	BtMA 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572 e 573

**Tabela 5** Continuação.

131	Balsas	8	4(50,0%)	BtMA 574, 575, 576 e 577
132	Riachão	10	3(30,0%)	BtMA 578, 579 e 580
133	Riachão	22	14(63,63%)	BtMA 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593 e 594
134	Carolina	6	2(33,33%)	BtMA 595 e 596
135	Carolina	7	1(14,28%)	BtMA 597
136	Carolina	9	6(66,66%)	BtMA 598, 599, 600, 601, 602 e 603
137	Carolina	9	3(33,33%)	BtMA 604, 605 e 606
<b>TOTAL</b>		1225	383(31,26%)	

\***BtMA**= *Bacillus thuringiensis* do Maranhão (Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA)

## 4.2 Bioensaios seletivos

Dos 383 isolados de *B. thuringiensis* testados seletivamente em larvas de *A. aegypti*, 12 (3,13%) mostraram atividade larvicida superior a 50%, após 48 horas de aplicação do bacilo, que corresponde aos isolados BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 131, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 401, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560. Sendo que os isolados BtMA 25, BtMA 104, BtMA 401 e BtMA 560 apresentaram mortalidade de 100% após 48 horas de aplicação da bactéria, vale ressaltar que o BtMA 104, BtMA 401 e BtMA 560 atingiram 100% de mortalidade em apenas 24 horas após a exposição das larvas à bactéria (Tabela 6).

Do total, 124 isolados apresentaram mortalidade inferior a 30% e 14 mostraram mortalidade entre 30 e 50%, após 24 e 48 horas de aplicação. Nos bioensaios com os demais isolados, não se obteve mortalidade das larvas após 24 e 48 horas de experimento (Tabela 6).

**Tabela 6-** Bioensaios seletivos com isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense para larvas de *Aedes aegypti*.

Isolado	Mortalidade %		Classificação	Isolado	Mortalidade %		Classificação
	24hs	48hs			24hs	48hs	
BtMA 25	86,6	100	++++	BtMA 179	13,3	13,3	+
BtMA 64	6,6	76,6	+++	BtMA 189	3,3	3,3	+
BtMA 65	3,3	23,3	+	BtMA 193	20,0	20,0	+
BtMA 67	0	3,3	+	BtMA 194	13,3	66,6	+++
BtMA 68	6,6	30,0	+	BtMA 196	0	36,6	++
BtMA 69	3,3	16,6	+	BtMA 200	3,3	3,3	+
BtMA 70	13,3	13,3	+	BtMA 251	6,6	93,3	++++
BtMA 71	10,0	10,0	+	BtMA 352	3,3	3,3	+
BtMA 72	26,6	26,6	+	BtMA 353	0	3,3	+
BtMA 74	0	3,3	+	BtMA 355	3,3	6,6	+
BtMA 77	6,6	6,6	+	BtMA 356	3,3	3,3	+
BtMA 79	10,0	10,0	+	BtMA 357	3,3	3,3	+
BtMA 82	10,0	16,6	+	BtMA 359	6,6	10,0	+
BtMA 83	6,6	6,6	+	BtMA 360	6,6	6,6	+
BtMA 84	16,6	16,6	+	BtMA 361	3,3	6,6	+
BtMA 85	13,3	20,0	+	BtMA 362	6,6	6,6	+
BtMA 86	6,6	6,6	+	BtMA 366	3,3	3,3	+
BtMA 87	13,3	20,0	+	BtMA 368	0	3,3	+
BtMA 88	3,3	3,3	+	BtMA 369	3,3	6,6	+
BtMA 93	3,3	3,3	+	BtMA 371	0	3,3	+
BtMA 94	6,6	10,0	+	BtMA 372	3,3	3,3	+
BtMA 95	6,6	16,6	+	BtMA 374	3,3	3,3	+
BtMA 96	3,3	3,3	+	BtMA 375	3,3	3,3	+
BtMA 98	3,3	3,3	+	BtMA 377	23,3	26,6	+
BtMA 99	3,3	3,3	+	BtMA 378	3,3	3,3	+
BtMA 101	3,3	3,3	+	BtMA 379	3,3	3,3	+
BtMA 103	3,3	3,3	+	BtMA 381	3,3	3,3	+
BtMA 104	100	100	++++	BtMA 382	3,3	3,3	+
BtMA 106	3,3	3,3	+	BtMA 384	13,3	13,3	+
BtMA 107	3,3	3,3	+	BtMA 385	3,3	10,0	+
BtMA 108	3,3	3,3	+	BtMA 387	10,0	10,0	+
BtMA 109	3,3	3,3	+	BtMA 394	3,3	3,3	+
BtMA 111	10,0	13,3	+	BtMA 395	0	3,3	+
BtMA 112	6,6	10,0	+	BtMA 398	0	3,3	+
BtMA 114	6,6	6,6	+	BtMA 400	3,3	3,3	+
BtMA 115	13,3	13,3	+	BtMA 401	100	100	++++
BtMA 116	6,6	6,6	+	BtMA 402	3,3	3,3	+
BtMA 118	3,3	3,3	+	BtMA 403	3,3	3,3	+
BtMA 121	30,0	46,6	++	BtMA 404	3,3	10,0	+
BtMA 122	40,0	40,0	++	BtMA 405	3,3	3,3	+
BtMA 123	3,3	3,3	+	BtMA 406	3,3	6,6	+
BtMA 124	3,3	3,3	+	BtMA 407	6,6	6,6	+
BtMA 128	6,6	6,6	+	BtMA 408	3,3	6,6	+
BtMA 129	20,0	23,3	+	BtMA 409	3,3	10,0	+
BtMA 131	20,0	76,6	+++	BtMA 410	0	96,6	++++
BtMA 178	26,6	26,6	+	BtMA 412	3,3	3,3	+

**Tabela 6** Continuação.

BtMA 413	0	93,3	++++	BtMA 504	13,3	20,0	+
BtMA 416	0	3,3	+	BtMA 505	0	30,0	+
BtMA 417	0	6,6	+	BtMA 506	3,3	6,6	+
BtMA 418	3,3	3,3	+	BtMA 509	0	46,6	++
BtMA 420	3,3	10,0	+	BtMA 510	3,3	3,3	+
BtMA 427	3,3	3,3	+	BtMA 514	0	3,3	+
BtMA 429	3,3	3,3	+	BtMA 516	6,6	6,6	+
BtMA 437	0	3,3	+	BtMA 521	3,3	3,3	+
BtMA 438	3,3	3,3	+	BtMA 528	0	3,3	+
BtMA 440	3,3	3,3	+	BtMA 529	6,6	16,6	+
BtMA 442	33,3	33,3	++	BtMA 530	10,0	16,6	+
BtMA 444	13,3	40,0	++	BtMA 531	3,3	13,3	+
BtMA 447	0	3,3	+	BtMA 532	3,3	6,6	+
BtMA 448	3,3	3,3	+	BtMA 533	10,0	20,0	+
BtMA 450	73,0	96,6	++++	BtMA 534	6,6	6,6	+
BtMA 451	0	86,6	++++	BtMA 536	10,0	10,0	+
BtMA 458	3,3	3,3	+	BtMA 537	0	6,6	+
BtMA 459	6,6	6,6	+	BtMA 540	3,3	10,0	+
BtMA 460	13,3	26,6	+	BtMA 546	0	3,3	+
BtMA 462	23,3	26,6	+	BtMA 548	0	3,3	+
BtMA 472	3,3	3,3	+	BtMA 550	20,0	20,0	+
BtMA 477	3,3	3,3	+	BtMA 554	0	3,3	+
BtMA 495	0	3,3	+	BtMA 555	3,3	3,3	+
BtMA 497	16,6	30,0	+	BtMA 556	33,3	33,3	+
BtMA 498	0	33,3	++	BtMA 558	0	33,3	+
BtMA 500	26,6	30,0	+	BtMA 559	6,6	6,6	+
BtMA 501	26,6	43,3	++	BtMA 560	100	100	++++
BtMA 502	10	13,3	+	BtMA 561	33,3	33,3	++
BtMA 503	33,3	33,3	++	BtMA 566	3,3	3,3	+

\***BtMA**= *Bacillus thuringiensis* do Maranhão (Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA);

\* **Em cada bioensaio foram testadas 30 larvas**

- ++++ = mortalidade > 80%
- +++ = mortalidade 50 ≤ 80%
- ++ = mortalidade 30 ≤ 50%
- + = mortalidade 1 ≥ 30%

### 4.3 Bioensaios quantitativos

Considerando-se a leitura de 24 horas após a aplicação do bacilo, observou-se que para os isolados de *B. thuringiensis* deste trabalho, com a dose  $1 \times 10^8$  obteve-se 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* nos testes com BtMA 401; 82,77% com BtMA 560; 9,44% com BtMA 104 e o isolado BtMA 25 não apresentou mortalidade para esta dose. Para as doses  $6,67 \times 10^7$ ,  $4,44 \times 10^7$  e  $2,96 \times 10^7$ , BtMA 401 mostrou mortalidade de 99,44%, 96,11% e 73,33% das larvas, respectivamente; a mortalidade para os demais isolados foi inferior a 50%. Considerando ainda a leitura de 24 horas, os resultados de mortalidade com o *Bti* foi de 100% até a dose  $2,96 \times 10^7$ , atingindo 98,3%, 96,6%, 95%, 86,6% e 61,6% nas concentrações de  $1,98 \times 10^7$ ,  $1,32 \times 10^7$ ,  $8,78 \times 10^6$ ,  $5,85 \times 10^6$  e  $3,90 \times 10^6$  (Tabela 7).

Em 48 horas, o isolado BtMA 401 apresentou mortalidade de 100% nas concentrações  $1 \times 10^8$ ,  $6,67 \times 10^7$  e  $4,44 \times 10^7$ , reduzindo para 87,22% na dose  $2,96 \times 10^7$ ; seguido do isolado BtMA 560 com 91,11% e 56,66% nas doses  $1 \times 10^8$  e  $6,67 \times 10^7$ . Os isolados BtMA 104 e BtMA 25 apresentaram mortalidade de 55,55% e 38,33% na concentração de  $1 \times 10^8$ , respectivamente. Nas demais doses obtiveram-se valores diferenciados de mortalidade entre os isolados, porém sendo menores que 50%. Com a bactéria padrão (*Bti*) observou-se mortalidade das larvas de até 90% na concentração de  $5,85 \times 10^6$  e de 75% na dose  $3,90 \times 10^6$  (Tabela 7).

Nos bioensaios com os demais isolados não foram obtidos índices de mortalidade das larvas em nenhuma das doses testadas.



**Tabela 7-** Mortalidade em percentagem por dose das larvas de *Aedes aegypti* nos bioensaios quantitativos com os isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense nos intervalos de leitura 24 e 48 horas.

Isolados	Leitura	Doses													Controle	Total de larvas	
		1x10 <sup>8</sup>	6,67x10 <sup>7</sup>	4,44x10 <sup>7</sup>	2,96x10 <sup>7</sup>	1,98x10 <sup>7</sup>	1,32x10 <sup>7</sup>	8,78x10 <sup>6</sup>	5,85x10 <sup>6</sup>	3,90x10 <sup>6</sup>	2,60x10 <sup>6</sup>	1,73x10 <sup>6</sup>	1,16x10 <sup>6</sup>	7,71x10 <sup>5</sup>			
BtMA 25	24h	0	0	0,55	1,11	0	0,55	1,11	1,11	0	0	0	0	0	0	0	2400
	48h	38,33	47,22	36,66	5,55	6,66	2,77	1,66	1,11	0	0	0	0	0	0	0	
BtMA 104	24h	9,44	5,55	6,66	13,88	1,11	2,77	1,66	2,77	0,55	1,66	1,11	0	0	0	0	2400
	48h	55,55	17,22	25,00	28,88	5,55	5,55	15,00	3,33	1,11	2,22	2,22	0	0	0	0	
BtMA 401	24h	100	99,44	96,11	73,33	29,44	4,44	0,55	0	0	0	0	0	0	0	0	2400
	48h	100	100	100	87,22	39,44	7,77	2,77	0	0	0	0	0	0	0	0	
BtMA 560	24h	82,77	39,44	6,66	7,77	7,22	5,00	2,77	2,77	0	0	0	0	0	0	0	2400
	48h	91,11	56,66	27,22	41,66	19,44	13,88	12,77	5,00	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Bti</i> *	24h	100	100	100	100	98,3	96,6	95	86,6	61,6	18,3	5	3,3	1,6	0	0	840
	48h	100	100	100	100	100	100	100	90	75	21,6	8,3	5	3,3	0	0	

**BtMA**= *Bacillus thuringiensis* do Maranhão (Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA);

\*Utilizada como linhagem padrão;

#### 4.4 Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>)

Os quatro isolados testados nos bioensaios quantitativos se adequaram à análise de regressão linear, apresentando valores significativos para o teste *t* (>1,96) ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto três isolados (BtMA 25, BtMA 104 e BtMA 560) não mostraram-se adequados para análise de Probit, pois os resultados mostraram valores de  $\chi^2$  calculado maior que o  $\chi^2$  esperado ou tabelado (Tabela 8).

Os valores de CL<sub>50</sub> dos isolados de *B. thuringiensis* para as larvas de *A. aegypti* estão representados na tabela 8. Em geral, observou-se diferença entre as concentrações requeridas dos isolados para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *A. aegypti*, que variou de  $4,0 \times 10^4$  (BtMA 401) a  $0,84 \times 10^8$  (BtMA 104) esporos-cristais/mL de *B. thuringiensis*.

Os menores valores de CL<sub>50</sub> foram obtidos com o isolado BtMA 401 com 4,0 (3,4-4,7)  $\times 10^4$  e com a bactéria padrão *Bti* com 0,32 (0,26-0,40)  $\times 10^7$ . Entre os demais isolados testados o menor valor de CL<sub>50</sub> foi obtido com BtMA 560 ( $0,65 \times 10^8$  IC  $0,46 \cdot 10^8$ - $0,12 \cdot 10^9$ ), similar à BtMA 25 com CL<sub>50</sub> ( $0,73 \times 10^8$  IC  $0,54 \cdot 10^8$ - $0,12 \cdot 10^9$ ) e BtMA 104 que obteve CL<sub>50</sub> de  $0,84 \times 10^8$  ( $0,45 \cdot 10^8$ - $0,36 \cdot 10^9$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8-** Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Aedes aegypti* após 48 horas de aplicação.

Isolados	N	Inclinação ±DP	Dose (esporos- cristais/mL)	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	$\chi^2$ (GL)
<i>Bti</i>	180	4.857±0.457*	$0,32 \times 10^7$	$0,32 (0,26-0,40) \times 10^7$	9.9448 (4)
BtMA 25	180	2.593±0.192*	$0,73 \times 10^8$	$0,73 (0,54 \cdot 10^8-0,12 \cdot 10^9)$	26.795 (6)
BtMA 104	180	1.511±0.106*	$0,84 \times 10^8$	$0,84 (0,45 \cdot 10^8-0,36 \cdot 10^9)$	39.194 (5)
BtMA 401	180	4.460±0.276*	$4,0 \times 10^4$	$4,0 (3,4-4,7) \times 10^4$	2.5322 (2)
BtMA 560	180	3.073±0.181*	$0,65 \times 10^8$	$0,65 (0,46 \cdot 10^8-0,12 \cdot 10^9)$	41.357 (4)

N - Número total de insetos testados/dose;

DP - Desvio Padrão;

IC - Intervalo de Confiança;

$\chi^2$  - Qui-quadrado;

GL - Grau de Liberdade;

\* - Significativo ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.5 Caracterização molecular

### 4.5.1 Caracterização gênica

Os 12 isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram mortalidade superior a 50%, selecionados previamente por sua ação larvicida em *A. aegypti*, foram caracterizados para detecção da presença dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*.

Os isolados BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560, amplificaram para um ou mais genes estudados. Destacando-se os isolados BtMA 25 e BtMA 410, que amplificaram para três genes e, BtMA 413, BtMA 450 e BtMA 451, onde as ampliações foram positivas para dois genes testados. Entre os genes pesquisados, os pertencentes à família dos genes de ação citolítica (*cyt*) foram mais frequentes que os genes do crystal (*cry*), sendo *cyt1Aa* e *cyt2Aa* os mais frequentes (Tabela 9).

Não foram observados fragmentos amplificados de DNA para nenhum dos genes testados nos isolados BtMA 131 e BtMA 401. Nenhum dos isolados amplificaram o DNA para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry10Aa* (Tabela 9).

**Tabela 9-** Genes detectados nos isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense que apresentaram mortalidade superior a 50% para larvas de *Aedes aegypti*.

Isolados	Genes							
	Cry					cyt		
	<i>cry4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cry10Aa</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa</i>	<i>cyt1Ab</i>	<i>cyt2Aa</i>
BtMA 25	-	-	-	+	+	+	-	-
BtMA 64	-	-	-	-	-	+	-	-
BtMA 104	-	-	-	-	-	+	-	-
BtMA 131	-	-	-	-	-	-	-	-
BtMA 194	-	-	-	-	-	-	-	+
BtMA 251	-	-	-	-	-	-	+	-
BtMA 401	-	-	-	-	-	-	-	-
BtMA 410	-	-	-	+	-	-	+	+
BtMA 413	-	-	-	+	-	-	-	+
BtMA 450	-	-	-	-	-	+	-	+
BtMA 451	-	-	-	-	-	+	-	+
BtMA 560	-	-	-	+	-	-	-	-

(+) Apresentou amplificação para o gene; (-) não apresentou amplificação para o gene.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e seleção de *Bacillus thuringiensis*

Nas atividades de isolamento de *B. thuringiensis* desenvolvidas neste estudo, observou-se um percentual de 31,26% de *B. thuringiensis* em 1225 colônias bacterianas obtidas, estando presente em 39 das 45 amostras analisadas, com variação de 3,44 a 87,5%. Índice semelhante para o isolamento de *B. thuringiensis* foi obtido por Mourão (2013), a partir da prospecção de *B. thuringiensis* em amostras de solo coletadas nos diferentes biomas brasileiros. Também analisou o Bioma Cerrado e verificou que de 72 amostras, obteve um total de 521 isolados; destes, 26,24% foram identificados como *B. thuringiensis*.

Os índices de *B. thuringiensis* isolados a partir de amostras de solo tem mostrado valores diferentes nas diversas regiões brasileiras. No norte do país, Silva et al. (2002) analisaram 35 amostras, obtendo-se um total de 212 colônias bacterianas, destas, apenas 6,6% foram identificadas como *B. thuringiensis*. No Amazonas, Soares-da-Silva (2011) analisou 25 amostras de solo, provenientes de dez municípios do estado e obteve 484 colônias bacterianas, sendo 57 identificadas como *B. thuringiensis*, o que corresponde a 11,7%. Já no Rio Grande do Sul Polanczyk et al. (2004), analisaram 85 amostras de solo, sendo obtidas 772 colônias bacterianas. Dentre estas, 293 (37,9%) foram identificados como *B. thuringiensis*. Para o estado de São Paulo na região Sudeste, Silva et al. (2002) descreveram um índice em torno de 40,0%, enquanto que para o Nordeste do país este índice foi cerca de 17,0%.

Segundo Meadows (1993), Hossain et al. (1997) e Polanczyk e Alves (2003), o solo funciona como o principal reservatório de esporos de *B. thuringiensis* na natureza e se constitui no substrato mais utilizado para as atividades de isolamento de *Bacillus* spp. Várias teorias discutem a presença e permanência do *B. thuringiensis* no solo. Hossain et al. (1997) admitem que se deve pela ocorrência de insetos que servem de substrato para crescimento e dispersão desta espécie. Polanczyk (2004) sugere que a sua ampla distribuição pode estar relacionada ao vento e a chuva que atuam na dispersão dos esporos do Bt em diversos ambientes.

Outros fatores que podem estar relacionados à variação de *B. thuringiensis* em regiões brasileiras são atividades como plantações de arroz e soja, bem como as condições climáticas, as características de cada solo e a composição química desse solo (POLANCZYK, 2004; POLANCZYK et al., 2009).

Portanto, são muitos os fatores que influenciam a eficiência do isolamento de linhagens de *B. thuringiensis*, dos quais sobressai a escolha do substrato, o método de coleta em campo e o processo de identificação da espécie. Isto prova que há a necessidade de continuidade nos estudos sobre isolamento e padronização de métodos para diferentes condições de solo (SOARES-da-SILVA, 2015).

Na identificação de *B. thuringiensis*, a análise morfológica dos cristais protéicos constitui um elemento importante. De acordo com Glare e O'Callaghan (2000), o formato dos cristais de toxina são indicadores da especificidade das linhagens, sendo os cristais bipiramidais comumente descritos com ação em Lepidoptera, enquanto aqueles com formato ovóide e cubóide possuem ação larvicida para Diptera.

Os bioensaios seletivos com *B. thuringiensis* obtidos neste trabalho, mostraram atividade larvicida para *A. aegypti* em 3,13% dos 383 isolados testados. A baixa ocorrência de linhagens com ação em mosquitos vetores também foi relatada por Praça et al. (2004), que estudando a seleção de *B. thuringiensis* com ação em larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, de 300 isolados testados, apenas dois apresentaram toxicidade, que corresponde a um índice de menos de 1%. Estudos semelhantes foram realizados por Dias et al. (2002), que mostraram atividade de linhagens de *B. thuringiensis* com ação tóxica em larvas de *A. aegypti* em apenas 1,9% dos isolados.

Apesar do amplo espectro de ação do *B. thuringiensis* em diversas ordens de insetos, a predominância inseticida desse bacilo é em larvas de Lepidoptera (SILVA-WERNECK et al., 2000; POLANCZYK, 2004) e Coleoptera (MARTINS et al., 2003; SILVA, 2008), embora algumas linhagens mostrem ação larvicida em outras ordens de insetos, como Hymenoptera (PINTO et al., 2003) e Diptera (VILARINHOS et al., 1998; CAVADOS et al., 2001; DIAS et al., 2002), o que ocorre geralmente em baixa frequência. A patogenicidade dessa espécie de bactéria para insetos de importância em Saúde Pública é relativamente baixa, quando comparada ao efeito tóxico do bacilo em outras ordens de inseto (DIAS et al., 2002; SILVA et al., 2002; COSTA et al., 2010).

A alta prevalência de isolados com ação em Lepidoptera foi mostrada por Cavaleiro et al. (2005), que de 14 isolados testados, 13 apresentaram toxicidade para esta ordem, enquanto que apenas um isolado mostrou toxicidade para a ordem Diptera. Gobatto et al. (2010), também relataram a predominância de linhagens específicas para Lepidoptera, onde verificaram que 61% apresentaram ação contra insetos desta ordem e somente 22,6% para Diptera.

No geral há mais toxinas descritas com ação para as ordens Lepidoptera e Coleoptera, e são relatadas cerca de 95 toxinas ativas para a ordem Diptera, o que é menor quando comparado a outros grupos (VAN FRANKENHUYZEN, 2009; 2013).

## 5.2 Bioensaios quantitativos (CL<sub>50</sub>)

Os bioensaios em condições de laboratório, realizados com os isolados do cerrado Maranhense, no geral, evidenciaram uma ação larvicida menor quando comparados à atividade do *Bti* (linhagem padrão). Nestes bioensaios, o maior percentual de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas após a ingestão do bacilo pela larva, com exceção dos resultados obtidos com os isolados BtMA 25 e BtMA 104, onde o maior impacto de mortalidade ocorreu em 48 horas.

Alto impacto nas primeiras 24 horas em experimentos com *B. thuringiensis* foram igualmente relatadas por Costa et al. (2010) e Soares-da-Silva et al. (2015), os quais verificaram 100% de mortalidade das larvas neste intervalo. A ação larvicida nas primeiras horas de contato também é descrita em bioensaios com outras espécies de *Bacillus*. Rodrigues et al. (1998), Litaiff (2002) e Oliveira (2005) obtiveram mortalidade em larvas de *Anopheles* spp. e *C. quinquefasciatus* nas primeiras horas de contato.

A Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) é um parâmetro de avaliação de toxicidade, a qual exige uma série de condições, para que possa ser estimada com maior precisão possível. Um requisito importante é a determinação do número de concentração do bacilo, composto de pelo menos cinco doses (DULMAGE, 1990; ALVES, 1998). Condição considerada para a realização dos bioensaios neste estudo, onde foram empregadas diluições seriadas a partir da cultura do bacilo. Entretanto, como não se pode determinar com precisão quanto as larvas ingerem de bactéria em cada dose, determinou-se a quantidade de esporos/cristal presente na cultura total do bacilo (VILARINHOS et al. 1996; LITAIFF, 2002).

Os isolados BtMA 25 ( $\chi^2 = 26,8$  gl 6), BtMA 104 ( $\chi^2 = 39,2$  gl 5) e BtMA 560 ( $\chi^2 = 41,3$  gl 4) não se adequaram aos requisitos para a análise de Probit (ALVES, 1998). O qui-quadrado significativo nestes três isolados revela que os resultados de mortalidade nas doses seriadas não mostraram efeitos tóxicos distintos, ou seja, em algumas doses, houve similaridade no percentual de mortalidade observada.

Para a determinação da CL<sub>50</sub> é necessário exatidão nos bioensaios, esta requer um amplo número de mortalidade dos insetos, para um calculo com mais exatidão é necessário

percentuais de mortalidade que mostrem uma curva de mortalidade, a não obtenção destes dados podem comprometer a exatidão da análise (DULMAGE et al. 1990).

Ao comparar os valores de  $CL_{50}$  obtidos com os quatro isolados de *B. thuringiensis* testados neste trabalho, verificou-se que a linhagem padrão *Bti*, apresentou  $CL_{50} = 0,32 \times 10^7$  esporos-cristais/mL, concentração do bacilo para atingir o parâmetro de mortalidade de 50% da população testada. Entre os isolados do cerrado Maranhense, o que apresentou maior toxicidade foi BtMA 401 com  $CL_{50}$  de  $4,0 \times 10^4$  esporos-cristais/mL. Os isolados BtMA 25, BtMA 104 e BtMA 560 apresentaram atividade larvicida mais baixa, os valores de  $CL_{50}$  variaram de  $0,73 \times 10^8$ ,  $0,84 \times 10^8$  e  $0,65 \times 10^8$  esporos-cristais/mL, respectivamente.

Outros trabalhos relacionando a obtenção da Concentração Letal Mediana de *B. thuringiensis* enfatizam o potencial deste agente biológico no controle de *A. aegypti*. Praça et al. (2004) obtiveram  $CL_{50}$  de 4,9200 e 4,4900  $\mu\text{g/mL}$  para os isolados S234 e S997, respectivamente, e os resultados com *Bti* foi de 1,6  $\mu\text{g/mL}$ . Dias et al. (2002) não encontraram linhagens com toxicidade superior à da linhagem padrão, sendo que os valores das estirpes testadas nesse estudo variou entre 6,77 a 41,59  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, Costa et al. (2010) obtiveram cinco isolados mais efetivos que a linhagem padrão após três horas de exposição das larvas ao bacilo, estes apresentaram  $CL_{50}$  entre  $0,01 \times 10^5$  e  $0,03 \times 10^5$  esporos/mL, sendo que o *Bti* nas mesmas condições obteve  $CL_{50}$  de  $0,04 \times 10^5$  esporos/mL.

Os resultados obtidos neste estudo com os isolados de *B. thuringiensis* do cerrado Maranhense mostram grande potencial para o controle biológico de mosquitos vetores de doença, tais como a dengue. Atualmente, o controle biológico é uma alternativa ou complemento viável para as estratégias de controle dessa doença, que priorize o manejo integrado, reduzindo os inconvenientes de possível desenvolvimento de resistência em mosquitos.

### 5.3 Caracterização molecular

Neste estudo observou-se a presença dos genes *cryIIAa*, *cryIIBa*, *cytIAa*, *CytIAb* e *cyt2Aa*, relacionados à ação larvicida para *A. aegypti*. No trabalho realizado por Mourão (2013) para a detecção dos genes *cry* nos diferentes biomas brasileiros, foi observado um grande percentual desses genes no bioma Cerrado, representando 46,88% com a presença dos mesmos.

A frequência elevada de toxinas citolíticas encontradas nos isolados de *B. thuringiensis* do Cerrado Maranhense ativos para *A. aegypti* mostra a importância dessas

toxinas na patogenicidade de linhagens para mosquitos. Corroborando com o trabalho de Costa et al. (2010), onde a frequência obtida de genes *cyt* foi elevada, em que das 45 amostras que apresentaram amplificação, 24 foram positivas para os iniciadores *cyt*. Entretanto, contrasta com Costa et al. (2014), que relataram percentuais menores de genes *cyt*, pois foram testados 500 isolados de *B. thuringiensis*, e somente seis (1,2%) continham essas toxinas.

Geralmente em pesquisas que tem por objetivo investigar a presença desses genes mosquitocida, é importante investigar a frequência dos genes das toxinas citolíticas, isso se deve a eficiência deste gene para ordens de insetos, principalmente contra dípteros, pois essas toxinas desempenham papel fundamental na ação contra mosquitos, atuando diretamente na inserção das outras toxinas de *B. thuringiensis* no epitélio intestinal das larvas (PÉREZ et al., 2005; BRAVO et al., 2007).

É importante ressaltar a presença de dois isolados que tiveram atividade larvicida, porém não apresentaram os genes relacionados à ação para mosquito. A não detecção de genes utilizados nesses isolados, mas que mostram atividade patogênica para *A. aegypti* demonstra a necessidade de ampliar as descrições dos genes ou outros fatores associados com a toxicidade, apontando para a possibilidade da presença de outros genes ou toxinas. Tendo a necessidade de ampliação da investigação molecular dos outros genes, incluindo o perfil proteico desses isolados. Ocorrência igualmente observada por Soares-da-Silva (2011) testando isolados do Amazonas para *A. aegypti*, onde verificou que de seis isolados ativos, cinco (83,3%) não amplificaram para nenhum dos genes estudados.

Atualmente, existem 53 toxinas, sendo 15 Cry e cinco Cyt testadas e que apresentam atividade larvicida para *A. aegypti*, sendo esta espécie mais frequentemente testada, seguido pelo gênero *Culex* e *Anopheles*. As famílias de toxina que apresentam toxicidade para *A. aegypti*, além das presentes no *Bti*, são Cry 1, Cry 2, Cry 16, Cry 20, Cry 24, Cry 32, Cry 44 e Cyt 2B (VAN FRANKENHUYZEN, 2009; CRICKMORE, 2014). Toxinas estas, não testadas neste trabalho, abrindo a possibilidade da existência de outros genes pertencentes a estas famílias com ação para Diptera nestes dois isolados, e também, a realização de mais PCR para detecção de outros genes codificadores de toxinas.

Desta forma, na atividade de caracterização de uma linhagem, não se pode desvincular as análises moleculares do comportamento observado nos bioensaios seletivos. Com base nisso, torna-se evidente a importância desta atividade como fundamento para elucidar os mecanismos de ação de isolados de *B. thuringiensis* para mosquitos (SOARES-da-SILVA, 2015).



Na determinação dos genes, verificou-se neste estudo dentre os dez isolados que apresentaram ampliações, 30% foram positivas para ambos os genes (*cry* e *cyt*), sendo que estes isolados também mostraram boa efetividade, o que pode ser devido à associação das duas classes de toxinas. Sabe-se que ambas agem em sinergismo quando presente no mesmo isolado, aumentando o poder de toxicidade dessas linhagens. Praça et al. (2004) observaram que a toxicidade de alguns isolados a insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre toxinas mosquitocida ativas de *B. thuringiensis*, ou até mesmo pela interação das toxinas com os esporos dessa bactéria.

Alguns trabalhos mostram que há uma alta associação entre as toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa, o que pode ser à base das interações sinérgicas para larvas de dípteros. A eficiência da interação dessas toxinas é devido à capacidade dessas de se liga através de epítomos existentes em ambas as moléculas destes genes. Outros estudos têm relatado patogenicidade da toxina Cry11Aa para larvas de *A. aegypti*, sendo verificada que essa proteína é a mais ativa encontrada no cristal de *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) (TABASHNIK, 1992; PÉREZ et al., 2005; BEN-DOV, 2014).

O isolado BtMA 25 amplificou para os genes *cry11Aa*, *cry11Ba* e *cyt1Aa*. Segundo Orduz et al. (1998) o *cry11Ba* presente isoladamente de outros genes é altamente tóxica às larvas de mosquitos. Entretanto Costa et al. (2010) trabalhando com genes *cry* e *cyt* observaram que o gene *cry11Ba* em combinação com genes *cyt* não apresentaram atividade larvicida satisfatória, evidenciando que, nesse caso, os genes *cyt* não agem em sinergismo com *cry11Ba*, ao contrário da combinação *cry11Aa* e *cyt1Aa*.

Em nenhum dos isolados analisados nesta pesquisa foi detectado a presença dos genes das toxinas Cry4Aa e Cry4Ba. A ausência desses genes foi igualmente reportada por Dias et al. (2002) e Praça et al. (2004), que descreveram isolados com ação tóxica para *A. aegypti*, que também não apresentaram os genes *cry4*. Entretanto, Sousa-Filho (2007) analisou 16 isolados que continham o gene *cry4*, porém não apresentaram toxicidade em bioensaios com *A. aegypti*, sugerindo este gene possui baixa expressão ou especificidade para outros dípteros.

Os resultados encontrados evidenciam o potencial dos isolados do Cerrado Maranhense para o controle de *A. aegypti*, no entanto é necessário ampliar as pesquisas sobre a atividade larvicida dos isolados de *B. thuringiensis*, no sentido de elucidar e descrever outros genes associados à produção de toxinas inseticidas. Bem como, complementar esta pesquisa com estudos sobre a influência das características químicas do solo na obtenção desses isolados.

## 6 CONCLUSÃO

### Isolamento e seleção:

- ✓ Foram isoladas 383 colônias de *B. thuringiensis* de solo do Cerrado Maranhense, este esteve presente em 39 amostras analisadas;
- ✓ 12 isolados apresentaram patogenicidade para larvas de *A. aegypti* superior a 50% nos bioensaios seletivos, enquanto que, os demais isolados mostraram baixa ação larvicida;
- ✓ O índice de *B. thuringiensis* ativo para *A. aegypti*, mostra que os isolados do Cerrado Maranhense possuem potencial para o controle biológico desse vetor.

### Bioensaios quantitativos (CL<sub>50</sub>):

- ✓ A linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresentou alta atividade larvicida no bioensaio quantitativo;
- ✓ O isolado BtMA 401 é o mais promissor para ser utilizado no controle de larvas de *A. aegypti*, pois apresentou menor valor de CL<sub>50</sub>;
- ✓ Os isolados tóxicos deste trabalho se constituem em um acervo potencial para a busca de novas formulações de inseticidas biológicos no controle de *A. aegypti* e outros vetores.

### Caracterização molecular:

- ✓ Os 12 isolados analisados mostraram alta atividade larvicida e através da técnica de PCR confirmou-se a presença de cinco dos oito genes verificados para estes isolados sendo: *cry11Aa*, *cry11Ba*, e *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*, onde cinco desses apresentaram ampliações para dois ou mais genes;
- ✓ Os resultados encontrados neste estudo em relação à caracterização molecular evidenciam o potencial dos isolados do Cerrado Maranhense para o controle de *A. aegypti*, no entanto é necessário ampliar a descrição de todos os genes associados à produção de toxinas inseticidas, bem como o mecanismo de ação entre os isolados mais potentes.

## REFERÊNCIAS

- AGAISSE, H; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, Nov. 1995.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S. B.; MORAES S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 765-777.
- ARONSON, A. I. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: Insecticidal proteins and postexponential survival. **Molecular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 489-496, Feb. 1993.
- BARRETO, M. R. **Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos praga da cultura da soja**. 2005. 107f. (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, dez. 2008.
- BARTH, O. M. Dengue vírus e vetor: O vírus. **IOC/Fiocruz**. Disponível em:<<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>> Acesso em: 08 jan. 2014.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI R.; MANASHEROB R.; KHAMRAEV A.; TROITSKAYA E.; DUBITSKY A.; BEREZINA N.; MARGALITH Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, Dec. 1997.
- BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, v. 6, p. 1222-1243, Mar. 2014.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 295-302, out-dez. 2007a.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, out-dez. 2007b.
- BRASIL. FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas**. Brasília/DF. 2001a.
- BRASIL. FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Controle biológico e manejo ambiental**. 2001b.
- BRASIL. MS - Ministério da Saúde. FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Dengue: Características clínicas e epidemiológicas. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 6. ed. Brasília-DF, 2005.

BRASIL- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**, 7. ed. Brasília-DF, 2006.

BRASIL- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2008). **Guia de vigilância epidemiológica**. 9. ed. Brasília-DF, 2008.

BRASIL. MS- Ministério da Saúde. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde, **Informe Epidemiológico da Dengue**, Análise de situação e tendências. 2010.

BRASIL. MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Semana epidemiológica 36 de 2013. **Balanco dengue**. Salvador, 2013.

BRASIL, MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 9, 2015**. Brasília-DF, 2015.

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *B. thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal Bacteriology**, v. 179, n. 9, p. 2793-2801, May. 1997.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, Dec. 1998.

BRAVO A.; GILLB S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L.; IATROU, K.; GILL, S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam, Elsevier BV, 2005. p. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt Toxins and Their Potential for Insect Control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, Mar. 2007.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; Dos SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS R. R. C. De. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

CAMARGO, M. F.; SANTOS, A. H.; OLIVEIRA, A. W. S.; ABRAÃO, N.; ALVES, R. B. N.; ISAC, E. Avaliação da ação residual do larvicida temefós sobre o *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, p. 65-70, 1998.

CAPRARA, A.; LIMA, J. W. O.; MARINHO, A. C. P.; CALVASINA, P. G.; LANDIM, L. P.; SOMMERFELD, J. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 125-136, Jan. 2009.

- CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Profiles. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, Nov. 2001.
- CARVALHO, M. S. L. E. D.; CALDAS, N. D.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIKAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 623-629, maio. 2004.
- CAVADOS, C. F. G.; FONSECA, R. N.; CHAVES, J. Q.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. Identification of Entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 1017-1021, Oct. 2001.
- CAVALEIRO, H.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; MEDEIROS, P. T.; GOMES, A. A. M. M.; MONNERAT, R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 87, p. 1-22, 2005.
- CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M. De.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 541-544, Aug. 2004.
- CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERRECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3826-3831, Nov. 1995.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228p.
- COPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 24, 2005.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides. A review of the reaction, application and efficacy. **Pest Management Science Sussex**, v. 56, n. 88, p. 651-676, 2000.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H. LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, out./dez. 2005.
- COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. da C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, V. F. M.; DESIDÉRIO, J. A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 757-766, Sep-Oct. 2010.

COSTA, M. L. M.; LANA, U. G. P.; BARROS, E. C.; PAIVA, L. V.; VALICENTE, F. H. Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* cyt Genes and Their Effect Against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 7, p. 128-137, Jun. 2014.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Falmer, 2014. Disponível em: <[http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)>. Acesso em: 05 ago. 2014.

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria; from laboratory to field application**. Netherlands: Klumer Academis Publishers, 2000. p. 23-40.

DANTES, H. G. ; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 19-31, 2009.

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

DELÉCLUSE, A.; PÉREZ, V. J.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE A.; LeROUX, C. N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.101-26, 2000.

DESPRÉS, L.; STALINSKI, R.; FAUCON, F.; NAVRATIL, V.; VIARI, A.; PARIS, M.; TETREAU, G.; POUPARDIN, R.; RIAZ, M. A.; BONIN, A.; REYNAUD, S.; DAVID, J. P. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. **Biology Letters**, v. 10, n. 12, p. 20140716, Dec. 2014.

DIAS, D. G. S.; SILVA, S. F. Da; MARTINS, E. S.; SOARES, C. M. S.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; DIAS, J. M. C. De S.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002. n. 30, 26p.

DONALISIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 373-382, dez. 2002.

DULMAGE, H. T.; YOUSTEN, A. A.; SINGER, S.; LACEY, L. A. **Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus***. Geneva. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, 1990. 59p.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3 ed. S. Ramnagar, Chand e Company Ltd, New Del, 1981. 333p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia**. 1. ed. São Paulo: Edusp, 2002. 860p.

FREITAS, R. M.; RODRIGUES, C. S.; ALMEIDA, M. C. M. Estratégia intersectorial para o controle da dengue em Belo Horizonte (Minas Gerais), Brasil. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 773-785, set. 2011.

GEPLAN - **Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico** (Atlas do Maranhão) Governo do Estado do Maranhão. São Luis: GEPLAN, 2002.

GERIS, R.; SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A. G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* DUCKE with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 25-28, Jan-Feb. 2008.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: Biology, ecology and safety**. 1.ed. Chichester: John Wiley, 2000. 350p.

GOBATTO, V.; GIANI, S. G.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; SPECHT, A.; BARROS, N. M. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1039-1046, Nov. 2010.

GONZALEZ, J. M.; CARLTON, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid**, New York, v. 11, n. 1, p. 28-38, Jan. 1984.

GUBLER, D. J.; REITER, P.; EBI, K. L.; YAP, W.; NASCI, R.; PATZ, J. A. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 223-233, May. 2001.

GUO, S.; LI, X.; HE, P.; HO, H.; WU, Y.; HE, Y. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Apr 10, 2015.

HABIB, M. E. M. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância de médica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 31-34, 1989.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap.12, 1998. p. 383-446.

HADDAD, M. L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 999-1012.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, Jun. 1989.

HOSSAIN, M. A.; AHMED, S.; HOQUE, S. Abundance and Distribution of the *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, n. 3, p. 221-225, Nov. 1997.

JOHNSON, D. E.; MCGAUGHEY, W. H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indian meal moth larvae. **Current Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 54-59, Jul. 1996.

KUO, W.S.; CHAK, K. F. Identification of Novel Cry-Type Genes from *B. thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction of Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1369-1377, Apr. 1996.

LEITE, J. J. G.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M. ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 110-113, Mar./Apr. 2009.

LENZI, M. F.; COURA, L. C. Prevenção da dengue: a informação em foco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 343-350, jul-ago. 2004.

LERECLUS, D.; ARANTÈS, O.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 60, n. 2, p. 211-218, Jul. 1989.

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 7, p. 815-821, 1991.

LITAIFF, E. C. **Controle da malária: Isolamento, Caracterização molecular e avaliação da atividade larvicida contra *Anopheles darlingi* e *Anopheles nuneztovari*, de estirpes de *Bacillus sphaericus* da Amazônia.** 2002. 89f. (Dissertação de Mestrado), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2002.

MARTINS, E. S.; SONE, E. H.; FALCÃO R.; GOMES A. C.; MONNERAT, R. G. Análise funcional e ultraestrutural de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). *Emb Rec Gen e Biotec. Microbiology*, v. 98, p. 823-831, 2003.

MEADOWS, M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and the risk assessment. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice.** Chichester: John Wiley, 1993. p. 193-220.

MEDEIROS, P. T.; SONE, E. H.; SOARES, C. M. S.; DIAS, J. M. C. S. MONNERAT, R. G. Evaluation of insecticides based on *Bacillus thuringiensis* in control of the diamondback moth. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 245-248, 2006.

MOEHLECKE, R. Doenças Negligenciadas. **Dengue: informação e ações efetivas ajudam a combater à doença.** 2013. Disponível em <<http://www.agencia.fiocruz.br/dengue-informação-e-ações-efetivas-ajudamcombater-à-doença>> Acesso em: 08 jan. 2014.

MOURÃO, A. H. C. **Prospecção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* nos diferentes biomas brasileiros.** 2013. 36f. TCC (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas). Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas – MG, 2013.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, Oct. 2013.



OLIVEIRA, R. M. A dengue no Rio de Janeiro: repensando a participação popular em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 69-78, 1998.

OLIVEIRA, C. D. **Análise da toxicidade, da sintomatologia e da histopatologia em larvas de *Culex* (Linnaeus, 1758), *Anopheles* e *Aedes* (Meigen, 1818) (Diptera, Culicidae) frente à ação de estirpes de *Bacillus sphaericus* (Neide, 1904), em condições de laboratório.** 2005. 108f. (Dissertação de Mestrado), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2005.

ORDUZ, S.; REALPE, M.; ARANGO, R.; MURILLO, L. A.; DELÉCLUSE, A. Sequence of the *cry11Bb* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1388, n. 1, p. 267-272, Oct. 1998.

PAMPLONA, L. G. C.; LIMA, J. W. O.; CUNHA, J. C. L.; SANTANA, E. W. P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de alvenaria do município de Canindé, Ceará, Brasil após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 400-404, set-out. 2004.

PAMPLONA, L. G. C.; PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; JÚNIOR, F. J. P.; FRUTUOSO, R. L.; SOUSA E. P, FILHO, F. F. D.; LIMA, J. W. O. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 638-44, ago. 2007.

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

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n.2, p. 255-281, Jun. 2007.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1529-1536, Nov./Dec. 2002.

PINHEIRO, V. C. S. **Controle do Dengue em Manaus-AM: Estudo da positividade/productividade larvária, viabilidade dos ovos e investigação por RT-PCR dos sorotipos do vírus dengue em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).** 2005. 164f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2005.

PINTO, L. M. N.; BERTIZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. In: ALMEIDA, A. L. (Ed.). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano XI, nº 38, 2003. p. 24-31.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, Uruguai, v. 7, n. 2, p. 1-10, fev. 2003.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813-816, dez. 2003.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 144f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Lepidoptera: Noctuidae. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 2, p. 209-214, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ZANÚNCIO, J. C.; ALVES, S. B. Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 1-5, Jan./Feb. 2009.

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

QUIMBAYO, M.; RÚA-URIBE, G.; PARRA-HENAO, G.; TORRES, C. Evaluation of lethal ovitraps as a strategy for *Aedes aegypti* control. **Biomedica**, v. 34, n. 3, p. 473-82, Jul-Sep. 2014.

REBÊLO, J. M. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, F. S.; PEREIRA, Y. N. O.; SILVA, J. M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 477-486, Jul./Sep. 1999.

ROCHA, L. A.; TAUIL, P. L. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 18-22, jan-fev. 2009.

RODRIGUES, I. B.; TADEI, W. P.; DIAS, J. M. C. S. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 93: 441-444. 1998.

SAMPAIO, J. C. **A longevidade do *Aedes aegypti* durante a estação chuvosa no município de Fortaleza**. 2010. 115f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – Ceará, 2010.

SARASWATHY, N.; KUMAR, P. A. Protein engineering of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 180-190, Aug. 2004.

SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Cloning and Expression of the *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 5, p. 2893-2897, May. 1981.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 349-355, jul-ago. 1999.

SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. De S.; MONNERAT, R. G. Isolamento, Identificação e caracterização entomopatogênica de Bacilos de diferentes regiões brasileiras. Brasília: Embrapa 4p. **EMBRAPA- Cenargen, Comunicado Técnico**, out. 2002.

SILVA, N. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae* L., 1763**. 2008. 50f. Dissertação de Mestrado (mestrado em Microbiologia Agropecuária), Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

SILVA-WERNECK, J. O.; ABREU-NETO, J. R. M. V.; TOSTES, A. N.; FARIA, L. O.; DIAS, J. M. C. De S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 221-227, jan. 2000.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. Da C.; CONCEIÇÃO, S. Da R.; KUSTER, R. M.; MARTINS, A. De O. F. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SOARES-DA-SILVA, J. **Controle da Dengue: Isolamento, Caracterização Molecular e Atividade Larvicida de *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1911 em *Aedes aegypti* LINNAEUS 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2011.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINEIRO, V. C. S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANCZYK, R. A.; TADEI, W. P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 1-6, 2015.

SOUSA-FILHO, A. **Isolamento e Caracterização Molecular de *Bacillus thuringiensis* do Estado do Amazonas**. 2007. 48f. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas/Escola Superior de Ciências da Saúde. Manaus, Amazonas, 2007.

TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3343-3346, Oct. 1992.

TAN, F.; ZHU, J.; TANG, J.; TANG, X.; WANG, S.; ZHENG, A.; LI, P. Cloning and Characterization of Two Novel Crystal Protein Genes, cry54Aa1 and cry30Fa1, from *Bacillus thuringiensis* Strain BtMC28. **Current Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 654–659, Mar. 2009.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, maio- jun. 2002.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 7-18, Jan. 2009.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 1-16, Mar. 2009.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 76-85, 2013.

VILARINHOS, P. T. R.; MARUNIAK, J. E.; HALL, D. W. Characterization and biological activity of a brazilian isolate of *Bacillus sphaericus* (Neide) highly toxic to mosquito larvae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91: 771-776. 1996.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 383-432.

WHO - World Health Organization. **Informal consultation the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Special Programme For Research and Training in Tropical Diseases, UNDP/World Bank/WHO. Geneva, 1985. 24p.

WHO - World Health Organization. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**, 11/12, 84, 85-96, 2009.

WHO - World Health Organization. **Global Alert and Response (GAR)**. Publicado em: 2009. Impact of Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>> Acesso em: 21 dez. 2013.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed). **Etmopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.

ZHONG, W.; SHOU, Y.; YOSHIDA, T. M.; MARRONE, B. L. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3446-3449, May. 2007.

## APÊNDICES

## 1. PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

### 1.1 Periódico e classificação na WebQualis da CAPES na área de avaliação Medicina II:

ISSN	Título	Estrato	Área de Avaliação
0085-5626	Revista Brasileira de Entomologia (Impresso)	B3	Medicina II

### 1.2 Normas Editoriais/Normas para os autores

#### Escopo e política:

A Revista Brasileira de Entomologia (RBE), em nome da Sociedade Brasileira de Entomologia (SBE), publica artigos originais revisados por especialistas em Entomologia, com foco na sistemática, diversidade e evolução dos insetos. A RBE mantém seções de comunicações breves, resenhas de livros e anúncios de interesse geral. Pontos de vista ou comentários podem ser publicados, a convite do Conselho Editorial. Devido a políticas editoriais atuais, será dada prioridade aos trabalhos com abordagem inovadora e que representem uma contribuição mais sólida para o conhecimento de grupos focados, incluindo uma discussão mais detalhada do campo temático, com uma abordagem comparativa.

Não há cobrança de página quando pelo menos um dos autores é um membro da SBE. Se nenhum autor é um membro da SBE, há uma taxa de publicação de R\$ 50,00 por página impressa de autores brasileiros e US\$ 25 por página publicada aos autores estrangeiros. Para manuscritos com menos de três autores. Para manuscritos com mais de três autores, a taxa de publicação será, respectivamente, R\$ 100,00 e US\$ 50. Exceto a edição on-line ([www.scielo.br/rbent](http://www.scielo.br/rbent)) que é gratuita.

Autores vão pagar uma taxa adicional de R\$ 100,00 (US\$ 50) por página colorida na edição impressa. No entanto, a publicação de figuras e fotografias coloridas na edição on-line é gratuita (preto e branco na versão impressa).

Os manuscritos devem ser de preferência em Inglês. Além disso, o manuscrito não deve ultrapassar 120 páginas, incluindo figuras. Em caso de manuscritos mais longos, os autores devem consultar o Conselho Editorial previamente à submissão.

#### Forma e preparação de manuscritos:

Os manuscritos devem ser submetidos on-line no endereço <http://mc04manuscriptcentral.com/rbent-SciELO>. O documento principal deve ser editado, de

preferência em Microsoft Word®, em papel de tamanho A4, espaço duplo, utilizando fonte Times New Roman tamanho 12; a margem direita não deve ser justificada e as páginas devem ser numeradas consecutivamente. O tipo de letra Times New Roman, também deve ser usado para rotulagem das figuras e gráficos. Apenas tabelas e gráficos devem ser incorporadas ao arquivo no final do texto.

O documento principal deve ter uma página de rosto contendo o título e o nome do(s) autor(es) seguido de um número(s) para a remissão da nota de rodapé. A nota deve conter o endereço completo do(s) autor(es), incluindo e-mail, e outras informações pertinentes, se necessário. Palavras inteiramente em maiúsculas não devem ser empregadas, exceto como indicado a seguir. O resumo deverá ter no máximo 250 palavras, apresentado em parágrafo único, (o título do trabalho também deve ser incluído no início do resumo); PALAVRAS-CHAVE, em Inglês, organizados em ordem alfabética e no máximo cinco palavras-chave; Palavras já incluídas no título e no resumo não devem ser usadas como palavras-chave.

Os nomes científicos devem ser seguidos de autor e data de publicação na primeira menção a estes no manuscrito. Nomes de Gêneros e espécies devem ser escritos usando *itálico*. Não devem ser utilizados quaisquer outras indicações ou sinais para enfatizar ou chamar a atenção. O Conselho Editorial decidirá como proceder em casos particulares em manuscritos de outras áreas, como Sistemática, Morfologia e Biogeografia.

No texto, as referências devem ser escritas da seguinte forma: Canhedo (2004); (Canhedo 2003, 2004); (Canhedo 2004; Martins & Galileo 2004); (Parra *et al.* 2004); Parra *et al.* (2004); Martins & Galileo (2003a); (Martins & Galileo 2003a,b).

Ilustrações - fotografias, desenhos, gráficos e mapas são chamados de figuras e devem ser numeradas consecutivamente (em algarismos arábicos) e, de preferência, na mesma sequência em que são referidos no texto. Barras de escala devem ser posicionadas na vertical ou na horizontal. Tabelas (numeradas com algarismos romanos) deverão ser apresentadas em folhas separadas, no final do manuscrito. Se necessário, os gráficos podem também ser incluídos no final do documento principal. Ilustrações devem ser enviadas em arquivos separados do documento principal, com pelo menos 300 dpi para imagens coloridas e 600 dpi para bitmap e imagens em preto e branco, em formato TIFF ou JPEG de baixa compressão. Colocações preferenciais para tabelas e ilustrações podem ser indicadas no texto. Os números das figuras devem estar em Times New Roman, tamanho 11 e posicionado no canto inferior direito. Rotulagem aplicada a figuras (números, letras e palavras) também deve estar em Times New Roman e em um tamanho adequado, a fim de que, após a redução, eles permanecem

claramente visíveis, sem se tornar mais importante do que as próprias ilustrações. O Conselho Editorial poderá fazer pequenas alterações ou solicitá-las ao(s) autor(s). As legendas das figuras devem ser incluídas no documento principal.

Os AGRADECIMENTOS devem ser colocados no final do texto, imediatamente antes das Referências. Os autores devem ser sucintos. Use os exemplos a seguir quando preparar a seção de referências:

1. Revistas (periódicos) - (o título da revista deve ser citado por extenso, usando negrito):

Galeano-Olaya, P.E. & Canal, N.A. 2012. Novas espécies de *Neosilla* McAlpine (Diptera: Lonchaeidae) e novos registros da Colômbia. **Papéis Avulsos de Zoologia** 52: 361-385.

Silveira, O.T., Silva, S.S., Pereira, J.L.G. & Tavares, I.S. 2012. Variação local-escala na diversidade de vespas sociais em na Floresta Amazônica em Caxiuanã, Pará, Brasil (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Revista Brasileira de Entomologia** 56: 329-346.

2. Livros:

Michener, C.D. 2007. **As abelhas do mundo**. Baltimore. A Johns Hopkins University Press, xiv + 913 p.

3. Capítulos de Livros:

Camargo, J.M.F. & Pedro, S.E.M. 2007. Meliponini Lepeletier, 1836, p.272-578. In: Moure, J.S., Urban, D. & Melo, G.A.R (Orgs.). **Catálogo de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical**. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, xiv + 1058 p.

4. Sites da Internet:

Gilligan, T.M., Baixeiras, J., Brown, J.W. & Tuck, K.R. 2012. T@RTS: Catálogo Online Word do Tortricidae (Ver 2.0.). Disponível em: <http://www.tortricid.net/catalogue.asp> (acessado em 25 de novembro de 2012).

Antbase. 2012. Disponível em: <http://www.antweb.org> (acessado em 21 de abril de 2012).

As citações de resumos de reuniões, teses e dissertações inéditas devem ser evitadas. Nas Comunicações, o texto não deve ser dividido em subseções. Deve ser fornecido um resumo e palavras-chave.



RBE aconselha os autores a depositar comprovantes e espécimes-tipo em museus públicos ou coleções permanentes de Universidades. É aconselhável que os autores, no momento da apresentação, indiquem claramente no manuscrito onde se espera que o seu material seja depositado. Rotulagem e indicação adequada de amostras de comprovação são de responsabilidade do autor.

Páginas serão enviadas ao autor correspondente e devem ser devolvidas, com as devidas correções, no prazo indicado.

O(s) autor(s) é (são) o único responsável pelo conteúdo científico do trabalho, bem como a correta aplicação das regras gramaticais. 10 (dez) separatas serão fornecidas, gratuitamente, para cada artigo publicado, independentemente do número de autores.

Os autores são aconselhados a olhar para as últimas edições da RBE para verificar formato e layout atual. Ao submeter o manuscrito, o autor pode indicar potenciais colaboradores. Por favor, inclua o nome completo, endereços e endereços eletrônicos. A escolha dos revisores, no entanto, permanecerá com os Editores.

### 1.3 Artigo propriamente dito:

#### **Isolamento e patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do Cerrado Maranhense para larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)**

Katiane dos Santos Lobo<sup>1</sup>

Joelma Soares da Silva<sup>2</sup>

Valéria Cristina Soares Pinheiro<sup>3</sup>

#### **RESUMO**

Isolamento e patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do Cerrado Maranhense para larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)

Atualmente a dengue é um grave problema de saúde pública, especialmente no Maranhão, onde verifica-se aumento do número de casos a cada ano e a circulação de vários sorotipos virais. O desenvolvimento de novas estratégias para o controle do *Aedes aegypti* é de extrema importância, para reduzir os casos da doença. Uma alternativa para o controle deste vetor é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis*, que apresenta toxicidade para o vetor da dengue. Neste estudo, buscou-se investigar o controle biológico de *A. aegypti*, com o uso de *B. thuringiensis* isolados do Cerrado Maranhense. Foram realizados isolamentos e bioensaios seletivos para determinar a atividade entomopatogênica contra as larvas de *A. aegypti*. A partir de 45 amostras de solo coletadas em 17 municípios do Cerrado Maranhense, obteve-se 1225 colônias bacterianas, sendo 383(31,26%) identificadas como *B. thuringiensis*. Dos 383 isolados testados nos bioensaios seletivos, 12(3,13%) mostraram

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança/Universidade Federal do Maranhão – UFMA; Email: katiamecx@hotmail.com/katiamecx@gmail.com.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão – Campus Codó-MA; Email: joelmasoares12@gmail.com.

<sup>3</sup> Centro de Estudos Superiores de Caxias/Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA; Email: vc\_pinheiro@hotmail.com.

atividade larvicida superior a 50% (BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 131, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 401, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560). Desta forma, conclui-se que os isolados de *B. thuringiensis* do Cerrado Maranhense apresentaram potencial para o controle biológico de *A. aegypti* e os demais isolados podem constituir um acervo que visem a seleção de linhagens com ação para outros insetos.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, Controle biológico, Dengue, Vetor.

## INTRODUÇÃO

Dentre as doenças tropicais, a dengue tornou-se um dos principais problemas de saúde pública não somente no Brasil, mas também em diversos países do mundo, sendo a segunda arbovirose mais importante em relação ao número de pessoas infectadas (Gubler *et al.* 2001; WHO 2013). É endêmica em mais de 100 países na África, nas Américas, no Leste do Mediterrâneo, no Sul e Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico (Sampaio 2010).

A dengue é uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico é um vírus pertencente à família Flaviridae, gênero Flavivirus. São conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue causador da forma clássica da doença: DENV-1, DENV-2, DENV-3, e DENV - 4 (Forattini 2002; Rocha & Tauil 2009). Entretanto no ano de 2013 foi anunciada a descoberta de um novo sorotipo do vírus da dengue a partir de amostras coletadas durante um surto da doença em 2007 no continente Asiático, confirmando assim a existência oficial de cinco tipos de dengue (Normile 2013).

O vírus da dengue é transmitido ao homem através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* as duas espécies mais importantes como vetor. O *A. aegypti* é o principal, e talvez, o único vetor nas Américas, enquanto que *A. albopictus* é vetor secundário na Ásia e no Pacífico (Consoli & Lourenço de

Oliveira 1994; Gubler *et al.* 2001). Uma vez com o vírus da dengue, a fêmea torna-se vetor permanente da doença (Souza 2010).

Dados do Ministério da Saúde apontam que, somente em janeiro e fevereiro de 2013, mais de 200 mil casos de dengue foram registrados no país, um aumento de 190% em relação ao mesmo período no ano anterior. Porém, o número de casos graves, em comparação com o mesmo período, reduziu em 44% e o número de óbitos em 20%, mas muito trabalho ainda é necessário para que a doença deixe de ser tão negligenciada (Moehlecke 2013). No primeiro semestre de 2014, foram registrados 87.136 casos da doença, que representa uma redução de 80% comparada ao ano de 2013, em relação ao número de casos graves e quantidade de óbitos houve uma redução de 84% e 95%, respectivamente, quando comparada com o ano anterior (MS 2014).

De acordo com último levantamento feito pela Vigilância Epidemiológica Estadual, o Maranhão teve no ano de 2014, uma redução de 50% no número de casos confirmados da dengue. Os dados analisados correspondem a um levantamento feito nos últimos sete meses, e comparados ao mesmo período de 2013. Segundo o levantamento, foram registrados, entre janeiro e julho, 1.921 casos da doença, enquanto que no mesmo período em 2013 eram 3.842 casos confirmados de dengue (SECC 2014).

Várias pesquisas estão sendo realizadas na busca por alternativas biológicas para o controle *A. aegypti*. A tendência atual é de restringir o uso de inseticidas químicos, em substituição, incentiva-se o uso de controle biológico e o manejo ambiental (Alves 1998; Polanczyk *et al.* 2003; Pamplona *et al.* 2004).

As bactérias entomopatogênicas formadoras de esporos possuem um grande potencial para o controle biológico de insetos. A presença de esporos lhe confere resistência às condições adversas ambientais, conferindo-as facilidade de produção em larga escala industrial (Habib & Andrade 1998; Polanczyk & Alves 2003). Dentre estas, podemos destacar

*Bacillus thuringiensis* (Bt), que é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de várias ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (Cavados *et al.* 2001; De Maagd *et al.* 2003).

O *B. thuringiensis* ocorre em diversos ambientes: como solo, folhas de plantas e algumas vezes em micro habitats favoráveis como, por exemplo, dentro de insetos mortos. O Bt apresenta uma série de vantagens tais como: segurança ambiental; boa duração no ambiente; capacidade de se reciclar em larvas mortas, desta forma, mantendo-se no ambiente; além disso, apresenta diversidade de toxinas, o que dificulta o desenvolvimento de resistência nos mosquitos (Habib & Andrade 1998; Polanczyk & Alves 2003).

A busca de novas linhagens de *B. thuringiensis* com potencialidades diferentes das atualmente conhecidas, apresenta-se como uma das prioridades nos projetos de pesquisa em diversas regiões do mundo (Schnepf & Whiteley 1981; Barreto 2005). Tendo em vista, a importância epidemiológica de *A. aegypti* como principal vetor da Dengue, e que *B. thuringiensis* proporciona letalidade às larvas, é necessário isolar novas linhagens mais promissoras para o controle desse vetor, em diferentes regiões, na tentativa de encontrar distintos espectros de ação (Silva 2008).

Aliado a isso, considerando-se que existem poucas pesquisas no Estado do Maranhão sobre a diversidade de *B. thuringiensis*, propôs-se a realização deste trabalho com intuito de buscar isolados de Bt do solo com poder de toxicidade para o *A. aegypti* e conseqüentemente que possam ser utilizadas no controle do vetor da dengue no Estado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e identificação de *Bacillus thuringiensis*

Para o isolamento de *B. thuringiensis* foram realizadas coletas de amostras de solo, oriundas de 17 municípios do Cerrado Maranhense. Os pontos de coleta das amostras foram georreferenciados por meio de aparelho GPS (Global Positioning System). As amostras foram coletadas com auxílio de espátula de madeira e acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL estéreis, sendo coletados solos de coloração escura, a uma profundidade de até 10 cm do nível do solo. O material foi acondicionado em caixa de isopor e transportado ao Laboratório de Entomologia Médica - LABEM do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA, as quais foram devidamente identificadas para posterior isolamento e identificação de Bt.

O isolamento das linhagens de *B. thuringiensis* foi realizado no LABEM do Centro CESC/UEMA. Os procedimentos para o isolamento de *B. thuringiensis* seguiram os métodos descritos por Polanczyk (2004), o qual é uma modificação do método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1985). Este procedimento consistiu em misturar 1g de solo à 10 mL de solução de sais (0,006 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 mM  $\text{CaCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,08 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,07 mM  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,006 mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente em solução salina a 1%. Uma alíquota de 1mL da solução foi homogeneizada e submetida a choque térmico de 80°C por 12 minutos e em gelo por 5 minutos. Após, 100  $\mu\text{L}$  da solução foram transferidas para placas de Petri contendo ágar nutriente, sendo posteriormente espalhadas na placa com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram invertidas e armazenadas para o crescimento das colônias em estufa bacteriológica a 28°C, durante 48 horas.

Após o crescimento, as colônias foram avaliadas quanto à morfologia: elevação, forma, estrutura e borda. As colônias que apresentaram características típicas de *Bacillus spp.* foram inoculadas em caldo nutriente, contendo penicilina G, servindo assim como meio seletivo, e colocadas em incubador rotativo a 28°C a 180 rpm por cerca de 48 horas. As colônias crescidas no meio com antibiótico foram observadas a fresco em microscópio de contraste de fase (aumento 100x), para verificar a presença de inclusão parasporais (cristais de proteínas).

Os isolados que apresentarem cristal foram identificados como *B. thuringiensis* e, posteriormente, depositadas no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - BBENMA, no LABEM do CESC/UEMA. Os isolados possuem código, formado de letras e números, e são nomeados de acordo com o BBENMA, BtMA: Bt – *Bacillus thuringiensis* e MA – Maranhão (*Bacillus thuringiensis* do Maranhão), seguido do número de identificação do isolamento.

### **Bioensaios seletivos**

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* que foram obtidas da colônia mantida no LABEM do CESC/UEMA. As larvas foram criadas sob condições de temperatura e umidade controladas, com temperatura em média de  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa a 85% e fotofase de 12 horas.

Para cada isolado, foi preparada réplica de três copos plásticos contendo 10 mL de água potável, 10 larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* e 1mL da cultura total do bacilo, crescido em Agar Nutriente a 28° C em estufa de crescimento bacteriológico, por um período de 5 dias, até ser verificada a esporulação. Em cada bioensaio, foi preparada uma réplica sem inoculação bacilar, servindo assim como controle negativo.

Após a aplicação do bacilo, com 24 e 48 horas, foi feita leitura de mortalidade das larvas, onde foram contados todos os indivíduos vivos e mortos, obtendo desta forma o percentual de mortalidade dos indivíduos (Dulmage *et al.* 1990). Considerou-se com atividade larvicida os isolados que apresentaram mortalidade acima de 50%.

## RESULTADOS

Foram analisadas 45 amostras de solo provenientes de 17 municípios do Cerrado Maranhense. Destas, foram obtidas 1225 colônias bacterianas, sendo 383 identificadas como *B. thuringiensis*, o que corresponde a 31,26% do total. O maior número de colônias bacterianas foi encontrado nas amostras 12 e 13 de Aldeias Altas com 203 e 93 colônias, respectivamente, seguido da amostra 67 de Bacabal com 84 colônias bacterianas (Tabela 1).

O maior percentual de isolados de *B. thuringiensis* obtido por amostra coletada, ocorreu com a amostra 118, proveniente do município de Paraibano, onde do total de 32 colônias bacterianas obtidas, 28 (87,5%) foram identificadas como *B. thuringiensis*, seguido das amostras 120 de São João dos Patos e 130 de Balsas, com índice de 85,71% e 83,33% de *B. thuringiensis*, respectivamente. Ressalta-se que das amostras analisadas, seis mostraram-se negativas, ou seja, não foi identificada nenhuma linhagem como Bt (Tabela 1).

Em termos quantitativos, o maior número de isolados de Bt obtidos de uma única amostra foi de 43 linhagens, proveniente da amostra 67 do município de Bacabal, seguido de 28 isolados obtidos da amostra 118 de Paraibano, e 25 da amostra 115 de Colinas (Tabela 1).

Dos 383 isolados de *B. thuringiensis* testados seletivamente em larvas de *A. aegypti*, somente 12 (3,13%) mostraram atividade larvicida superior a 50%, o que corresponde aos isolados BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 131, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 401, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560, que apresentaram mortalidade de



50 a 100% após 24 e 48 horas de aplicação do bacilo. Sendo que quatro isolados apresentaram mortalidade de 100% após 48 horas de aplicação da bactéria, vale ressaltar que o BtMA 104, BtMA 401 e BtMA 560 atingiram 100% de mortalidade em apenas 24 horas após a exposição das larvas à bactéria (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Nas atividades de isolamento de *B. thuringiensis* desenvolvidas neste estudo, observou-se um percentual de 31,26% de *B. thuringiensis* em 1225 colônias bacterianas obtidas, estando esta espécie presente em 39 das 45 amostras analisadas, com variação de 3,44 a 87,5%. Índice semelhante para o isolamento de *B. thuringiensis* foi obtido por Mourão (2013), a partir da prospecção de *B. thuringiensis* em amostras de solo coletadas nos diferentes biomas brasileiros. Em que de 72 amostras analisadas, obteve um total de 521 isolados; destes, 26,24% foram identificados como *B. thuringiensis*.

Os índices de *B. thuringiensis* isolados a partir de amostras de solo tem mostrado valores diferentes nas diversas regiões brasileiras. No norte do país, Silva *et al.* (2002) analisaram 35 amostras, obtendo-se um total de 212 colônias bacterianas, destas, apenas 6,6% foram identificadas como *B. thuringiensis*. No Amazonas, Soares-da-Silva (2011) analisou 25 amostras de solo, provenientes de dez municípios do estado e obteve 484 colônias bacterianas, sendo 57 identificadas como *B. thuringiensis*, o que corresponde a 11,7%. Já no Rio Grande do Sul Polanczyk *et al.* (2004), analisaram 85 amostras de solo, sendo obtidas 772 colônias bacterianas. Dentre estas, 293 (37,9%) foram identificados como *B. thuringiensis*. Para o estado de São Paulo, Silva *et al.* (2002) descreveram um índice em torno de 40,0%, enquanto que para o nordeste do país este índice foi cerca de 17,0%.

Segundo Meadows (1993), Hossain *et al.* (1997) e Polanczyk & Alves (2003), o solo funciona como o principal reservatório de esporos de *B. thuringiensis* na natureza. Hoje se constitui no substrato preferencialmente utilizado para as atividades de isolamento de *Bacillus* spp. Há várias teorias que discutem a presença e permanência do *B. thuringiensis* no solo. Hossain *et al.* (1997) admitem que isto se deve pela ocorrência de insetos que lhe servem de substrato para crescimento e dispersão. Polanczyk (2004) sugere que a ampla distribuição desse bacilo pode estar relacionada a fatores abióticos, tais como o vento e a chuva que atuam na dispersão dos esporos do bacilo em vários ambientes.

Outros fatores que podem estar relacionados à variação de *B. thuringiensis* em regiões brasileiras são atividades como plantações de arroz e soja, bem como as condições climáticas, as características de cada solo e a composição química desse solo (Polanczyk 2004, Polanczyk *et al.* 2009).

Os bioensaios seletivos com *B. thuringiensis* obtidos neste trabalho, mostraram atividade larvicida para *A. aegypti* em 3,13% dos 383 isolados testados. A baixa ocorrência de linhagens com ação em mosquitos vetores também foi relatada por Praça *et al.* (2004), que visando à seleção de *B. thuringiensis* com ação em larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, mostrou que de 300 isolados testados, apenas dois apresentaram toxicidade, o que corresponde a menos de 1%. Da mesma forma, Dias *et al.* (2002) descreveram atividade de linhagens de *B. thuringiensis* com ação tóxica em larvas de *A. aegypti* em apenas 1,9% dos isolados.

Apesar do amplo espectro de ação do *B. thuringiensis* em diversas ordens de insetos, a predominância inseticida desse bacilo é em larvas de Lepidoptera (Silva-Werneck *et al.* 2000; Polanczyk 2004) e Coleoptera (Martins *et al.* 2003; Silva 2008), embora algumas linhagens mostrem efeito tóxico para outras ordens de insetos, tais como Hymenoptera (Pinto *et al.* 2003) e Diptera (Vilarinhos *et al.* 1998; Cavados *et al.* 2001; Dias *et al.* 2002), o que ocorre

geralmente em baixa frequência. A patogenicidade dessa espécie de bactéria para insetos de importância em Saúde Pública é relativamente baixa, quando comparada à ação do bacilo em outras ordens de inseto (Dias *et al.* 2002; Silva *et al.* 2002; Costa *et al.* 2010).

A alta prevalência de isolados com ação em Lepidoptera foi mostrada por Cavaleiro *et al.* (2005), que de 14 isolados testados, 13 apresentaram toxicidade para esta ordem, enquanto que apenas um isolado mostrou toxicidade para a ordem Diptera. Gobatto *et al.* (2010), também relataram a predominância de linhagens específicas para Lepidoptera, onde verificaram que 61% apresentaram ação contra insetos desta ordem e somente 22,6% para Diptera. No geral há mais toxinas descritas com ação para as ordens Lepidoptera e Coleoptera, e são relatadas cerca de 95 toxinas ativas para a ordem Diptera, o que é menor quando comparado a outros grupos (Van Frankenhuyzen 2009, 2013).

Os resultados encontrados evidenciam o potencial dos isolados do Cerrado Maranhense para o controle de *A. aegypti*, no entanto é necessário complementar esta pesquisa com testes de bioensaios quantitativos que tem por objetivo determinar a toxicidade dos isolados que mostraram atividade entomopatogênica, estimando a Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>).

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo fomento. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo auxílio nesta pesquisa. À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança (PPGSAC).

## REFERÊNCIAS

- Alves, S.B. 1998. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1163p.
- Barreto, M.R. 2005. **Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos praga da cultura da soja**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 107p.
- Cavados, C.F.G., Fonseca, R.N., Chaves, J.Q., Rabinovitch, L., Araújo-Coutinho, C.J.P. 2001. Identification of Entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz** 96: 1017-1021.
- Cavaleiro, H., Praça, L.B., Martins, E.S., Medeiros, P.T., Gomes, A.A.M.M., Monnerat, R.G. 2005. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 87:1-22.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228p.
- Costa, J.R.V., Rossi, J.R., Marucci, S.C., Alves, E.C. da C., Volpe, H.X.L., Ferraudó, A.S., Lemos, V.F.M.; Desidério, J.A. 2010. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). **Neotropical Entomology** 39: 757-766.
- De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics** 37: 409-433.
- Dias, D.G.S., Silva, S.F. da, Martins, E.S., Soares, C.M.S., Falcão, R., Gomes, A.C.M.M., Praça, L.B., Dias, J.M.C. de S., Monnerat, R.G. 2002. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos**. Brasília-DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 26p.
- Dulmage, H.T., Yousten, A.A., Singer, S., Lacey, L.A. 1990. **Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus***. Geneva. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, 59p.
- Forattini, O.P. 2002. **Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia**. 1. ed. São Paulo: Edusp. 860p.

Gobatto, V., Giani, S.G., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Specht, A., Barros, N.M. 2010. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology** 70: 1039-1046.

Gubler, D.J., Reiter, P., Ebi, K.L., Yap, W., Nasci, R., Patz, J.A. 2001. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. **Environmental Health Perspectives** 109: 223–233.

Habib, M.E.M. & Andrade, C.F.S. 1998. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap.12, 383-446p.

Hossain, M.A., Ahmed, S., Hoque, S. 1997. Abundance and Distribution of the *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology** 70: 221-225.

Martins, E.S., Sone, E.H., Falcão R., Gomes A.C., Monnerat, R.G. 2003. Análise funcional e ultraestrutural de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). *Emb Rec Gen e Biotec. Microbiology* 98: 823-831.

Meadows, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and the risk assessment, p. 193-220. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester, John Wiley, xvii + 311 p.

Moehlecke, R. 2013. Doenças Negligenciadas. **Dengue: informação e ações efetivas ajudam a combater à doença**. Disponível em <<http://www.agencia.fiocruz.br/dengue-informação-e-ações-efetivas-ajudamcombater-à-doença>> (Acesso em 08 de janeiro de 2014).

Mourão, A.H.C. 2013. **Prospecção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* nos diferentes biomas brasileiros**. 2013. TCC (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas). Universidade Federal de São João Del-Rei. Sete Lagoas – MG. 36p.

MS - Ministério da Saúde. 2014. **Não dê tempo para dengue: Balanço de casos da Dengue e resultados do novo LIRAA**. Brasília-DF.

Normile, D. 2013. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science** 342: 415.

Pamplona, L.G.C., Lima, J.W.O., Cunha, J.C.L., Santana, E.W.P. 2004. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de alvenaria do município de Canindé, Ceará, Brasil após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37: 400-404.

Pinto, L.M.N., Bertiz, D.L., Castilhos-Fortes, R., Fiuza, L.M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*, 2003, p. 24-31. In: Almeida, A.L. (Ed.). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, xi + 74p.

Polanczyk, R.A. & Alves, S. 2003. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência** 7: 1-10.

Polanczyk, R.A., Garcia, M.O., Alves, S.B. 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública** 37: 813-816.

Polanczyk, R.A. 2004. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 144p.

Polanczyk, R.A., Silva, R.F.P., Fiuza, L.M. 2004. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Lepidoptera: Noctuidae. **Revista Brasileira de Agrociência** 10: 209-214.

Polanczyk, R.A., Zanúncio, J.C., Alves, S.B. 2009. Relationship between chemical properties of the soil and the occurrence of *Bacillus thuringiensis*. **Ciência Rural** 39: 1-5.

Praça, L.B., Batista, A.C., Martins, É.S., Siqueira, C.B., Dias, D.G.S., Gomes, A.C.M.M., Falcão, R., Monnerat, R.G. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Brasília, **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39: 11-16.

Rocha, L.A. & Tautil, P.L. 2009. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42: 18-22.

Sampaio, J.C. 2010. **A longevidade do *Aedes aegypti* durante a estação chuvosa no município de Fortaleza**. 2010. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – Ceará. 115p.

Schnepf, H.E. & Whiteley, H.R. 1981. Cloning and Expression of the *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 78: 2893-2897.

SECC - Secretaria de Estado da Casa Civil. 2014. **Maranhão registra redução de 50% nos casos de dengue em 2014**. São Luis-MA.

Silva, S.F., Dias, J.M.C. de S., Monnerat, R.G. 2002. Isolamento, Identificação e caracterização entomopatogênica de Bacilos de diferentes regiões brasileiras. **EMBRAPA-Cenargen, Comunicado técnico**. Brasília: Embrapa 4p.

Silva, N. 2008. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae* L., 1763**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo 50p.

Silva-Werneck, J.O., Abreu-Neto, J.R.M.V., Tostes, A. N., Faria, L.O., Dias, J.M.C. de S. 2000. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 221-227.

Soares-da-Silva, J. 2011. **Controle da Dengue: Isolamento, Caracterização Molecular e Atividade Larvicida de *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1911 em *Aedes aegypti* LINNAEUS 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 92p.

Souza, W. 2010. **Doenças negligenciadas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 56p.

Van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101: 1-16.

Van Frankenhuyzen, K. 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 114: 76–85.

Vilarinhos, P.T.R., Dias, J.M.C.S., Andrade, C.F.S., Araújo-Coutinho, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. 1998. p. 383-432. In: Alves, S.B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1163p.

WHO - World Health Organization. 1985. **Informal consultation the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Special Programme For Research and Training in Tropical Diseases, UNDP/World Bank/WHO. Geneva, 24p.

WHO - World Health Organization. **Global Alert and Response (GAR)**. 2009. Impact of Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>> (Acesso em 21 de dezembro de 2013).



**Tabela 1-** Índice de *Bacillus thuringiensis* obtidos a partir de amostra de solo de diversos municípios do Cerrado Maranhense.

<b>Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Colônias bacterianas (CB)</b>	<b><i>B. thuringiensis</i> Índice de <math>Bt=n(Bt/CB)*100</math></b>
1	Caxias	5	0(0%)
2	Caxias	44	0(0%)
3	Caxias	13	2(15,38%)
4	Caxias	4	1(25,0%)
5	Caxias	21	3(14,28%)
6	Caxias	19	0(0%)
7	Caxias	22	0(0%)
8	Caxias	19	0(0%)
9	Caxias	9	0(0%)
10	Caxias	20	1(5%)
11	Caxias	21	6(28,57%)
12	Aldeias Altas	203	7(3,44%)
13	Aldeias Altas	93	9(9,67%)
52	Arari	44	20(45,45%)
53	Arari	41	8(19,51%)
54	Santa Luzia	3	1(33,33%)
55	Santa Luzia	12	2(16,66%)
66	Bacabal	52	11(21,15%)
67	Bacabal	84	43(51,19%)
68	Alto Alegre do MA	27	6(22,22%)
69	Alto Alegre do MA	5	2(40,0%)
73	Parnarama	31	6(19,35%)
115	Colinas	33	25(75,75%)
116	Colinas	28	10(35,71%)
117	Colinas	30	16(53,33%)
118	Paraibano	32	28(87,5%)
119	Paraibano	24	17(70,83%)
120	São João dos Patos	28	24(85,71%)
121	São João dos Patos	20	14(70,0%)
122	São João dos Patos	13	9(69,23%)
123	Barão de Grajaú	7	5(71,42%)
124	Barão de Grajaú	22	14(63,63%)
125	Pastos Bons	8	2(25,0%)
126	Benedito Leite	33	13(39,39%)
127	Benedito Leite	27	17(62,96%)
128	São Raimundo das Mangabeiras	20	5(25,0%)
129	São Raimundo das Mangabeiras	13	3(20,07%)
130	Balsas	24	20(83,33%)
131	Balsas	8	4(50,0%)
132	Riachão	10	3(30,0%)
133	Riachão	22	14(63,63%)
134	Carolina	6	2(33,33%)
135	Carolina	7	1(14,28%)
136	Carolina	9	6(66,66%)
137	Carolina	9	3(33,33%)
<b>TOTAL</b>		<b>1225</b>	<b>383(31,26%)</b>

**Tabela 2-** Bioensaios seletivos com isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense para larvas de *Aedes aegypti*.

Isolado	Mortalidade %		Classificação	Isolado	Mortalidade %		Classificação
	24hs	48hs			24hs	48hs	
BtMA 25	53,3	86,6	++++	BtMA 442	33,3	33,3	++
BtMA 64	6,6	76,6	+++	BtMA 444	13,3	40,0	++
BtMA 68	6,6	30,0	+	BtMA 450	73,0	96,6	++++
BtMA 104	100	100	++++	BtMA 451	0	86,6	++++
BtMA 121	30,0	46,6	++	BtMA 497	16,6	30,0	+
BtMA 122	40,0	40,0	++	BtMA 498	0	33,3	++
BtMA 131	20,0	76,6	+++	BtMA 500	26,6	30,0	+
BtMA 194	13,3	66,6	+++	BtMA 501	26,6	43,3	++
BtMA 196	0	36,6	++	BtMA 503	33,3	33,3	++
BtMA 251	6,6	93,3	++++	BtMA 505	0	30,0	+
BtMA 401	100	100	++++	BtMA 509	0	46,6	++
BtMA 410	0	96,6	++++	BtMA 560	100	100	++++
BtMA 413	0	93,3	++++	BtMA 561	33,3	33,3	++

\*BtMA= *Bacillus thuringiensis* do Maranhão (Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA);

\*Em cada bioensaio foram testadas 30 larvas

++++ = mortalidade > 80%

+++ = mortalidade  $50 \leq 80\%$

++ = mortalidade  $30 \leq 50\%$

+ = mortalidade  $1 \geq 30\%$

## 2. SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

### 2.1 Periódico e classificação na WebQualis da CAPES na área de avaliação Medicina II:

ISSN	Título	Estrato	Área de Avaliação
0022-2011	Journal of Invertebrate Pathology (Print)	B1	Medicina II

### 2.2 Normas Editoriais/Normas para os autores

#### PREPARATION

##### *Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

##### *Article structure*

##### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### ***Essential title page information***

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### ***Keywords***

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Tables***

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### ***References***

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

## 2.3 Artigo propriamente dito:

### **Avaliação da toxicidade e detecção de genes *cry* e *cyt* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense para larvas de *Aedes aegypti***

Katiane dos Santos Lobo<sup>1</sup>, Joelma Soares da Silva<sup>2</sup>, Maria Cleoneide da Silva<sup>3</sup>, Valéria Cristina Soares Pinheiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança/Universidade Federal do Maranhão – UFMA; Email: katiamecx@hotmail.com/katiamecx@gmail.com.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão – Campus Codó-MA; Email: joelmasoares12@gmail.com.

<sup>3</sup> Centro de Estudos Superiores de Caxias/Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA; Email: cleouema@hotmail.com; vc\_pinheiro@hotmail.com.

## RESUMO

O desenvolvimento de novas estratégias para o controle do *Aedes aegypti* é de extrema importância, para minimizar as epidemias de dengue. Uma alternativa para o controle deste vetor é a utilização de agentes de controle biológico, como *Bacillus thuringiensis*, que apresenta toxicidade a mosquitos de importância epidemiológica. Sua propriedade larvicida é atribuída à produção de um cristal proteico, que contém  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt). Neste estudo, buscou-se investigar o potencial de isolados de *B. thuringiensis* do Cerrado Maranhense, enquanto agente de controle biológico de *A. aegypti*. Foram realizados bioensaios seletivos para determinar a atividade entomopatogênica contra as larvas de *A. aegypti*, bioensaios quantitativos com a finalidade de determinar a toxicidade dos isolados, por meio da estimativa da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para verificar a presença de genes mosquitocida. Dos 383 isolados testados, 12 (3,13%) mostraram atividade larvicida superior a 50% (BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 131, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 401, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560), aos quais foram selecionados para realização do bioensaio quantitativo e caracterização molecular. Os bioensaios quantitativos permitiram observar que os menores valores de CL<sub>50</sub> foram obtidos com o isolado 401 ( $4,0 \times 10^4$  esporos-cristais/mL) e com a bactéria padrão *Bti* ( $0,32 \times 10^7$  esporos-cristais/mL). Os demais isolados testados mostraram baixa atividade larvicida. Os testes de PCR mostraram que dos oito genes testados: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*, cinco destes: *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa* foram detectados em dez isolados, estando ausentes em apenas dois dos 12 isolados testados. Esses dados demonstram que os isolados de *B. thuringiensis* do Cerrado Maranhense apresentaram alta patogenicidade e potencial para o controle biológico de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, Controle biológico, Dengue, Vetor.

## 1. Introdução

O controle da dengue é geralmente realizado pela eliminação das larvas do *Aedes aegypti* por meio da eliminação dos criadouros ou da utilização do larvicida químico, como produtos com princípios ativos organoclorados, organofosforados e mais recentemente piretróides (CAMARGO et al., 1998; OLIVEIRA, 1998; RÊBELO et al., 1999; CARVALHO et al., 2004; QUIMBAYO et al., 2014).

Os inseticidas químicos apresentam desvantagens e restrições de uso bem conhecidas: são tóxicos ao homem, causam desequilíbrio nos ecossistemas em que são utilizados, por atuarem em insetos benéficos, e quando são intensivamente utilizados podem promover o desenvolvimento de populações de mosquitos resistentes (VILARINHOS et al., 1998; BRAGA; VALLE, 2007). Diante disso, há a necessidade de busca de novas estratégias mais eficazes e ecologicamente seguras, como alternativas para o controle de *A. aegypti* no país.

Várias pesquisas estão sendo realizadas na busca por alternativas biológicas para o controle de *A. aegypti*. A utilização de espécies predadoras (peixes larvófagos, copépodos), que atuam comendo as larvas em reservatórios aquáticos, está entre um dos mais antigos sistemas de controle biológico de mosquitos (MS, 2001; PAMPLONA et al., 2004; PAMPLONA et al., 2007).

A tendência atual é de restringir o uso de inseticidas químicos, em substituição, incentiva-se o uso de controle biológico e o manejo ambiental (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2003; PAMPLONA et al., 2004; GUO et al., 2015). As bactérias entomopatogênicas formadoras de esporos possuem um grande potencial para o controle biológico de insetos. A presença de esporos lhe confere resistência às condições adversas ambientais, conferindo-lhes facilidade de produção em larga escala industrial (HABIB; ANDRADE, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Embora sejam conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos são poucas aquelas que podem ser utilizadas no controle biológico de vetores de doenças tropicais. Dentre estas, podemos destacar *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de várias ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (CAVADOS et al., 2001; DE MAAGD et al., 2003).

Dentre as bactérias entomopatogênicas, *B. thuringiensis* constitui-se como componente ativo utilizado comercialmente nos biopesticidas. O sucesso desta bactéria como agente de controle biológico é devido à produção durante a esporulação de um cristal



protéico, no qual contêm toxinas inseticidas, comumente chamadas de  $\delta$ -endotoxinas (AGAISSE; LERECLUS, 1995; DELÉCLUSE et al., 2000; SARASWATHY; KUMAR, 2004). O cristal protéico de *B. thuringiensis* é considerado uma pró-toxina, ou seja, uma forma não ativa e somente quando em contato com meio alcalino ou em solução de enzima proteolítica, ocorre o processo de clivagem da pró-toxina, resultando em moléculas de tamanhos variados, as  $\delta$ -endotoxinas (KUO; CHAK, 1996; YAMAMOTO; DEAN, 2000, BRAVO et al., 2005, ZONG et al., 2007).

A propriedade larvicida de *B. thuringiensis* é atribuída à produção de um cristal proteico, que contêm  $\delta$ -endotoxinas, sendo as proteínas do Cristal - Cry as mais proeminentes, e as Citolíticas - Cyt que atuam sinergeticamente com as toxinas do cristal. Estas proteínas são sintetizadas sob condições restritas de crescimento, durante o processo de esporulação da bactéria e são codificadas por diferentes genes denominados genes *cry* e *cyt* (AGAISSE; LERECLUS, 1995; DE MAAGD et al., 2003; SARASWATHY, KUMAR, 2004).

A atividade entomopatogênica desta bactéria está associada com a síntese destas proteínas que são altamente tóxicas e específicas para insetos de várias ordens e outros invertebrados (HÖFTE; WITELEY, 1989; GLARE; O'CALLANGHAM, 2000). As variedades de proteínas Cry e Cyt são o resultado de um contínuo esforço na busca por toxinas com propriedades adequadas para o controle de insetos de importância agrícola e vetores de doenças (PIGOTT; ELLAR, 2007).

Com isso, a busca de novas linhagens de *B. thuringiensis* com potencialidades diferentes das atualmente conhecidas, apresenta-se como uma das prioridades nos projetos de pesquisa em diversas regiões do mundo (SCHNEPF; WHITELEY, 1981; BARRETO, 2005).

Considerando-se que existem poucas pesquisas no Estado do Maranhão sobre a diversidade de *B. thuringiensis*, propôs-se a realização deste trabalho com intuito de buscar isolados de Bt do solo com poder de toxicidade para o *A. aegypti* e conseqüentemente que possam ser utilizadas no controle do vetor da dengue. Além disso, a busca por novos isolados torna-se importante uma vez que possibilita encontrar novas combinações de toxinas dos genes *cry* e *cyt*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Isolados e seleção de *Bacillus thuringiensis*

Analisaram-se 383 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diversas localidades do Cerrado Maranhense, pertencentes ao Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - BBENMA, do LABEM no CESC/UEMA. Como linhagem padrão foi utilizada uma estirpe de *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Realizaram-se bioensaios seletivos seguindo a metodologia descrita por (DULMAGE et al., 1990), para se verificar a patogenicidade dos isolados e foram considerados com atividade larvicida os que apresentaram mortalidade acima de 50%, aos quais 12 isolados foram selecionados para posterior realização do bioensaio quantitativo e caracterização molecular.

### 2.2 Bioensaios quantitativos para avaliação da atividade larvicida em *A. aegypti*

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas larvas de terceiro estágio de *A. aegypti* que foram obtidas da colônia mantida no LABEM do CESC/UEMA. As larvas foram criadas sob condições de temperatura e umidade controladas, com temperatura em média de  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa a 85% e fotofase de 12 horas.

Os isolados selecionados no bioensaio seletivo foram testados em bioensaios de dose para a determinação da CL<sub>50</sub>. Para o preparo das suspensões de esporos/cristal, os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), foram cultivados em Placas de Petri com meio de cultura Agar Nutriente e incubados a 28°C durante 5 dias, permitindo assim a completa esporulação e liberação dos cristais. Após este período, todo o conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubos Falcon contendo 10 mL de água destilada autoclavada e 0,01% de Triton® X-100 (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada e, a partir desta, foram feitas três suspensões seriadas, sendo  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , respectivamente. A suspensão seriada  $10^{-2}$  foi utilizada para a contagem de esporos em microscópio óptico com auxílio da Câmara de NeuBauer (ALVES; MORAES, 1998), para a padronização à concentração de  $1,0 \times 10^8$  esporos-cristal/ml, constituindo a suspensão inicial testada no bioensaio de dose e, a partir desta concentração, foram preparadas suspensões diluídas seriadamente.

Os bioensaios foram realizados distribuindo-se, com auxílio de um micropipetador, 1 mL de cada suspensão dos isolados de *B. thuringiensis*, em copos descartáveis contendo 99 ml de água destilada e 20 larvas de 3º ínstar de *A. aegypti* em cada copo, imersas com auxílio

de pipetas Pasteur. O experimento foi conduzido em três repetições e, para comparação dos resultados, foi incluída a linhagem padrão (*Bti*) (controle positivo) e, copos sem a cultura bacteriana (controle negativo).

Nas primeiras 24 e 48 horas após aplicação das suspensões foi realizada a contagem de larvas vivas e mortas, foram considerados mortos os indivíduos que não responderem com movimentos ao ser tocados por um palito.

A determinação da Concentração Letal Mediana-CL<sub>50</sub>, foi realizada por meio da análise de Probit, utilizando-se o programa POLO PLUS (LeOra Software Berkeley, C.A.), calculada a partir dos dados de mortalidade das larvas nos bioensaios de dose (FINNEY, 1981; HADDAD, 1998).

### 2.3 Caracterização gênica

Para a detecção de genes *cry* e *cyt* com ação larvicida em Diptera, utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Foram pesquisados oito genes: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*, com ação tóxica para larvas de *A. aegypti* (Tabela 1).

Para a extração do DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foi utilizado o protocolo do Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad). Os isolados foram previamente cultivados em placas contendo meio Ágar Nutriente sólido, por 18h a 28°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1 mL de água estéril em tubos de microcentrífuga e levados à centrifugação por 1 min à 11.000 rpm à 20°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µL do Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56° C por 20 min, agitado rigorosamente em vórtex por 10 segundos e, logo após, incubado em água fervente (100°C) por 8 min. A amostra foi novamente agitada em vórtex por 10s e centrifugada a 20°C por 3 min a 11.000 rpm. Finalmente, 200 µL do sobrenadante foram colhidos e transferidos para um microtubo estéril, a qual foi estocada em freezer – 20° C até o momento do uso.

Para a realização das reações de amplificação dos genes *cry* e *cyt* foram utilizados solução tampão 1X; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1,0 µM de cada iniciador, 1 U *Taq* DNAPolimerase, 2,0 µl da amostra de DNA e 11,3 µl água destilada previamente esterilizada, para uma reação de 25 µl. O DNA padrão *Bti* foi utilizado como controle positivo nas reações de amplificação por PCR. Como controle negativo a quantidade de DNA foi substituída por água para injeção livre de DNase, previamente esterilizada.

A reação de amplificação dos genes foi realizada em termociclador *Gencycler-G96G* (Biosystems). Sendo o passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 30 seg a 50-57°C para anelamento dos iniciadores, e 1,0 min a 72°C para polimerização e um passo final para extensão de 7 min a 72°C.

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo. Após a reação de amplificação, foi retirado 5µL de cada amostra e adicionado em 3µL do corante Blue/Orange Loading Dye (Promega). As amostras foram aplicadas no gel de agarose, sendo este submetido a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA) em pH alcalino. Em cada reação de eletroforese, foi incluído 3µL de DNA Ladder 1Kb (Promega) como padrão de peso molecular, o qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos gerados. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados em um transiluminador ultravioleta e posteriormente foram fotografados em aparelho TCL Documentation (Vilber Lourmat).

### 3. Resultados

#### 3.1 Bioensaios quantitativos (CL<sub>50</sub>)

Levando-se em conta a leitura de 24 horas após a aplicação do bacilo, observou-se que nos isolados de *B. thuringiensis* deste trabalho, com a dose  $1 \times 10^8$  obteve-se 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* nos testes com BtMA 401; 82,77% com BtMA 560; 9,44% com BtMA 104 e o isolado BtMA 25 não apresentou mortalidade para esta dose. Para as doses  $6,67 \times 10^7$ ,  $4,44 \times 10^7$  e  $2,96 \times 10^7$ , BtMA 401 mostrou mortalidade de 99,44%, 96,11% e 73,33% das larvas, respectivamente; a mortalidade para os demais isolados foi inferior a 50%. Considerando ainda a leitura de 24 horas, os resultados de mortalidade com o *Bti* foi de 100% até a dose  $2,96 \times 10^7$ , atingindo 98,3%, 96,6%, 95%, 86,6% e 61,6% nas concentrações de  $1,98 \times 10^7$ ,  $1,32 \times 10^7$ ,  $8,78 \times 10^6$ ,  $5,85 \times 10^6$  e  $3,90 \times 10^6$  (Tabela 2).

Em 48 horas, o isolado BtMA 401 apresentou mortalidade de 100% nas concentrações  $1 \times 10^8$ ,  $6,67 \times 10^7$  e  $4,44 \times 10^7$ , atingindo 87,22% na dose  $2,96 \times 10^7$ ; seguido do isolado BtMA 560 com 91,11% e 56,66% nas doses  $1 \times 10^8$  e  $6,67 \times 10^7$ . Os isolados BtMA 104 e BtMA 25 apresentaram mortalidade de 55,55% e 38,33% na concentração de  $1 \times 10^8$ , respectivamente. Nas demais doses obtiveram-se valores diferenciados de mortalidade entre os isolados, porém

sendo menores que 50%. Com a bactéria padrão (*Bti*) observou-se mortalidade das larvas de até 90% na concentração de  $5,85 \times 10^6$  e de 75% na dose  $3,90 \times 10^6$  (Tabela 2).

Os quatro isolados testados nos bioensaios quantitativos se adequaram à análise de regressão linear, apresentando valores significativos para o teste *t* ( $>1,96$ ) ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto três isolados (BtMA 25, BtMA 104 e BtMA 560) não mostraram-se adequados para análise de Probit, pois os resultados mostraram valores de  $\chi^2$  calculado maior que o  $\chi^2$  esperado ou tabelado (Tabela 3).

Os menores valores de  $CL_{50}$  foram obtidos com o isolado BtMA 401 com 4,0 (3,4-4,7)  $\times 10^4$  e com a bactéria padrão *Bti* com 0,32 (0,26-0,40)  $\times 10^7$ . Entre os demais isolados testados o menor valor de  $CL_{50}$  foi obtido com BtMA 560 ( $0,65 \times 10^8$  IC  $0,46 \cdot 10^8$ - $0,12 \cdot 10^9$ ), similar à BtMA 25 com  $CL_{50}$  ( $0,73 \times 10^8$  IC  $0,54 \cdot 10^8$ - $0,12 \cdot 10^9$ ) e BtMA 104 que obteve  $CL_{50}$  de  $0,84 \times 10^8$  ( $0,45 \cdot 10^8$ - $0,36 \cdot 10^9$ ) (Tabela 3).

### 3.2 Caracterização gênica

Os 12 isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram mortalidade superior a 50%, selecionados previamente por sua ação larvicida em *A. aegypti*, foram caracterizados para detecção da presença dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*.

Os isolados BtMA 25, BtMA 64, BtMA 104, BtMA 194, BtMA 251, BtMA 410, BtMA 413, BtMA 450, BtMA 451 e BtMA 560, amplificaram para um ou mais genes estudados. Destacando-se os isolados BtMA 25 e BtMA 410, que amplificaram para três genes e, BtMA 413, BtMA 450 e BtMA 451, onde as ampliações foram positivas para dois genes testados. Entre os genes pesquisados, os pertencentes à família dos genes de ação citolítica (*cyt*) foram mais frequentes que os genes do crystal (*cry*), sendo *cyt1Aa* e *cyt2Aa* os mais frequentes (Tabela 4).

Não foram observados fragmentos amplificados de DNA para nenhum dos genes testados nos isolados BtMA 131 e BtMA 401. Nenhum dos isolados amplificaram o DNA para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry10Aa* (Tabela 4).

#### 4. Discussão

Os bioensaios em condições de laboratório, realizados com os isolados do cerrado Maranhense, em geral, evidenciaram uma ação larvicida menor quando comparados à atividade do *Bti* (linhagem padrão). Nestes bioensaios, o maior percentual de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas após a ingestão do bacilo pela larva, com exceção dos resultados obtidos com os isolados BtMA 25 e BtMA 104, onde o maior impacto de mortalidade ocorreu em 48 horas. Alto impacto nas primeiras 24 horas em experimentos com *B. thuringiensis* foram igualmente relatadas por Costa et al. (2010), os quais verificaram 100% de mortalidade das larvas nas primeiras horas de contato.

Ao comparar os valores de  $CL_{50}$  obtidos com os quatro isolados de *B. thuringiensis* testados neste trabalho, verificou-se que a linhagem padrão *Bti*, apresentou  $CL_{50} = 0,32 \times 10^7$  esporos-cristais/mL. Entre os isolados do cerrado Maranhense, o que apresentou maior toxicidade foi BtMA 401 com  $CL_{50}$  de  $4,0 \times 10^4$  esporos-cristais/mL. Os isolados BtMA 25, BtMA 104 e BtMA 560 apresentaram atividade larvicida mais baixa, os valores de  $CL_{50}$  variaram de  $0,73 \times 10^8$ ,  $0,84 \times 10^8$  e  $0,65 \times 10^8$  esporos-cristais/mL, respectivamente.

Outros trabalhos relacionando a obtenção da Concentração Letal Mediana de *B. thuringiensis* enfatizam o potencial deste agente biológico no controle de *A. aegypti*. Praça et al. (2004) obtiveram  $CL_{50}$  de 4,9200 e 4,4900  $\mu\text{g/mL}$  para os isolados S234 e S997, respectivamente, e os resultados com *Bti* foi 1,6  $\mu\text{g/mL}$ . Dias et al. (2002) não encontraram linhagens com toxicidade superior à da linhagem padrão, sendo que os valores das estirpes testadas nesse estudo variou entre 6,77 a 41,59  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, Costa et al. (2010) obtiveram cinco isolados mais efetivos que a linhagem padrão após três horas de exposição das larvas ao bacilo, estes apresentaram  $CL_{50}$  entre  $0,01 \times 10^5$  e  $0,03 \times 10^5$  esporos/mL, sendo que o *Bti* nas mesmas condições obteve  $CL_{50}$  de  $0,04 \times 10^5$  esporos/mL.

Neste estudo observou-se a presença dos genes *cryIIAa*, *cryIIBa*, *cytIAa*, *CytIAb* e *cyt2Aa*, relacionados à ação larvicida para *A. aegypti*. No trabalho realizado por Mourão (2013) para a detecção dos genes *cry* nos diferentes biomas brasileiros, foi observado um grande percentual desses genes no bioma Cerrado, representando 46,88% com a presença dos mesmos.

A frequência elevada de toxinas citolíticas encontradas nos isolados de *B. thuringiensis* do Cerrado Maranhense ativos para *A. aegypti* mostra a importância dessas toxinas na patogenicidade de linhagens para mosquitos. Corroborando com o trabalho de

Costa et al. (2010), onde a frequência obtida de genes *cyt* foi elevada, em que das 45 amostras que apresentaram amplificação, 24 foram para os iniciados *cyt*. Entretanto, contrasta com Costa et al. (2014), que relataram percentuais menores de genes *cyt*, pois foram testados 500 isolados de *B. thuringiensis*, e somente seis (1,2%) continham essas toxinas.

É importante ressaltar a presença de dois isolados que tiveram atividade larvicida, porém não apresentaram os genes relacionados à ação para mosquito. A não detecção de genes utilizados nesses isolados, mas que mostram atividade patogênica para *A. aegypti* demonstra a necessidade de ampliar as descrições dos genes ou outros fatores associados com a toxicidade. Ocorrência igualmente observada por Soares-da-Silva et al. (2015) testando isolados do Amazonas para *A. aegypti*, onde verificou que de seis isolados ativos, cinco (83,3%) não amplificaram para nenhum dos genes estudados.

Atualmente, existem 53 toxinas, sendo 15 Cry e cinco Cyt testadas e que apresentam atividade larvicida para *A. aegypti*, sendo esta espécie mais frequentemente testada, seguido pelo gênero *Culex* e *Anopheles*. As famílias de toxina que apresentam toxicidade para *A. aegypti*, além das presentes no *Bti*, são Cry 1, Cry 2, Cry 16, Cry 20, Cry 24, Cry 32, Cry 44 e Cyt 2B (VAN FRANKENHUYZEN, 2009; CRICKMORE, 2014). Toxinas estas, não testadas neste trabalho, abrindo a possibilidade da existência de outros genes pertencentes a estas famílias com ação para Diptera nestes dois isolados, e também, a realização de mais PCR para detecção de outros genes codificadores de toxinas.

Na determinação dos genes, verificou-se neste estudo dentre os dez isolados que apresentaram amplificações, 30% foram positivas para ambos os genes (*cry* e *cyt*), sendo que estes isolados também mostraram boa efetividade, o que pode ser devido à associação das três classes de toxinas, pois sabe-se que ambas agem em sinergismo quando presente no mesmo isolado, aumentando o poder de toxicidade dessas linhagens. Praça et al. (2004), observaram que a toxicidade de alguns isolados a insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre toxinas mosquitocida ativas de *B. thuringiensis*, ou até mesmo pela interação das toxinas com os esporos dessa bactéria.

O isolado BtMA 25 amplificou para os genes *cryIIAa*, *cryIIBa* e *cytIAa*. Segundo Orduz et al. (1998) o *cryIIBa* presente isoladamente de outros genes é altamente tóxica às larvas de mosquitos. Entretanto Costa et al. (2010) trabalhando com genes *cry* e *cyt* observaram que o gene *cryIIBa* em combinação com genes *cyt* não apresentaram atividade larvicida satisfatória, evidenciando que, nesse caso, os genes *cyt* não agem em sinergismo com *cryIIBa*, ao contrário da combinação *cryIIAa* e *cytIAa*.

Os resultados encontrados evidenciam o potencial dos isolados do Cerrado Maranhense para o controle de *A. aegypti*, no entanto é necessário ampliar as pesquisas sobre a atividade larvicida dos isolados de *B. thuringiensis*, no sentido de elucidar e descrever outros genes associados à produção de toxinas inseticidas.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo fomento. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo auxílio nesta pesquisa. À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança (PPGSAC).

### Referências

- AGAISSÉ, H; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, Nov. 1995.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S. B.; MORAES S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 765-777.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 295-302, out-dez. 2007.
- BRAVO A.; GILLB S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L.; IATROU, K.; GILL, S. (Eds.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam, Elsevier BV, 2005. p. 175-206.
- CAMARGO, M. F.; SANTOS, A. H.; OLIVEIRA, A. W. S.; ABRAÃO, N.; ALVES, R. B. N.; ISAC, E. Avaliação da ação residual do larvicida temefós sobre o *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, p. 65-70, 1998.
- CARVALHO, M. S. L. E. D.; CALDAS, N. D.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 623-629, maio. 2004.
- CAVADOS, C. F. G.; FONSECA, R. N.; CHAVES, J. Q.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. Identification of Entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 1017-1021, Oct. 2001.



COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. da C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, V. F. M.; DESIDÉRIO, J. A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 757-766, Sep-Oct. 2010.

COSTA, M. L. M.; LANA, U. G. P.; BARROS, E. C.; PAIVA, L. V.; VALICENTE, F. H. Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* cyt Genes and Their Effect Against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 7, p. 128-137, Jun. 2014.

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

DELÉCLUSE, A.; PÉREZ, V. J.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE A.; LeROUX, C. N. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.101-26, 2000.

DIAS, D. G. S.; SILVA, S. F. Da; MARTINS, E. S.; SOARES, C. M. S.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; DIAS, J. M. C. De S.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2002. n. 30, 26p.

DULMAGE, H. T.; YOUSTEN, A. A.; SINGER, S.; LACEY, L. A. **Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus***. Geneva. UNDP/World Bank/WHO, Steering Committee to Biological Control of Vectors, 1990. 59p.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3 ed. S. Ramnagar, Chand e Company Ltd, New Del, 1981. 333p.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety**. 1.ed. Chichester: John Wiley, 2000. 350p.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap.12, 1998. p. 383-446.

GUO, S.; LI, X.; HE, P.; HO, H.; WU, Y.; HE, Y. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Apr 10, 2015.

HADDAD, M. L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 999-1012.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, Jun. 1989.

KUO, W.S.; CHAK, K. F. Identification of Novel Cry-Type Genes from *B. thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction of Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1369-1377, Apr. 1996.

MS – Ministério da Saúde. FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Controle biológico e manejo ambiental**. 2001.

MOURÃO, A. H. C. **Prospecção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* nos diferentes biomas brasileiros**. 2013. 36f. TCC (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas). Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas – MG, 2013.

OLIVEIRA, R. M. A dengue no Rio de Janeiro: repensando a participação popular em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 69-78, 1998.

ORDUZ, S.; REALPE, M.; ARANGO, R.; MURILLO, L. A.; DELÉCLUSE, A. Sequence of the *cry11Bb* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1388, n. 1, p. 267-272, Oct. 1998.

PAMPLONA, L. G. C.; LIMA, J. W. O.; CUNHA, J. C. L.; SANTANA, E. W. P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de alvenaria do município de Canindé, Ceará, Brasil após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 400-404, set-out. 2004.

PAMPLONA, L. G. C.; PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; JÚNIOR, F. J. P.; FRUTUOSO, R. L.; SOUSA E. P., FILHO, F. F. D.; LIMA, J. W. O. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 638-44, ago. 2007.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n.2, p. 255–281, Jun. 2007.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, Uruguai, v. 7, n. 2, p. 1-10, fev. 2003.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813-816, dez. 2003.

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

QUIMBAYO, M.; RÚA-URIBE, G.; PARRA-HENAO, G.; TORRES, C. Evaluation of lethal ovitraps as a strategy for *Aedes aegypti* control. **Biomedica**, v. 34, n. 3, p. 473-82, Jul-Sep. 2014.

REBÊLO, J. M. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, F. S.; PEREIRA, Y. N. O.; SILVA, J. M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 477-486, Jul./Sep. 1999.

SARASWATHY, N.; KUMAR, P. A. Protein engineering of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 180-190, Aug. 2004.

SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Cloning and Expression of the *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 5, p. 2893-2897, May. 1981.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINEIRO, V. C. S.; LITAIFF-ABREU, E.; POLANCZYK, R. A.; TADEI, W. P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 1-6, 2015.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 383-432.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.

ZHONG, W.; SHOU, Y.; YOSHIDA, T. M.; MARRONE, B. L. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3446-3449, May. 2007.

**Tabela 1-** Primers utilizados na reação de PCR dos genes *cry* e *cyt* de *Bacillus thuringiensis* com ação específica para *Aedes aegypti*, com suas respectivas sequências, tamanho de fragmento esperado e temperatura de anelamento.

Gene (iniciadores)	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>cry4Aa</i> *	5' - GGGTATGGCACTCAACCCCACTT 3' - GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	1529	57
<i>cry4Ba</i> *	5' - GAGAACACACCTAATCAACCAAT 3' - GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	1951	50
<i>cry10Aa</i> #	5' - ATTGTTGGAGTTAGTGCAGG 3' - AATACTTTGGATGTGTCTTGAG	995	50
<i>cry11Aa</i> *	5' - CCGAACCTACTATTGCGCCA 3' - CTCCTGCTAGGATTCCGTC	470	50
<i>cry11Ba</i> #	5' - TACAGGATGGATAGGGAATGG 3' - TAATACTGCCATCTGTTGCTTG	608	52
<i>cyt1Aa</i> #	5' - AACTCAAACGAATAACCAAG 3' - TGTTCTTTACTGCTGATAC	300	53
<i>cyt1Ab</i> #	5' - AAGCAAGGGTTATTACATTACG 3' - CCAATACTAAGATCAGAGGG	698	54
<i>cyt2Aa</i> #	5' - GCATTAGGAAGACCATTTG 3' - AAGGCTAAGAGTTGATATCG	361	53

Fonte: \*Primers desenhados por Ben Dov et al. (1997);

#Primers desenhados por Costa et al. (2010).

**Tabela 2-** Mortalidade em porcentagem por dose das larvas de *Aedes aegypti* nos bioensaios quantitativos com os isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense nos intervalos de leitura 24 e 48 horas.

Isolados	Leitura	Doses									Controle
		1x10 <sup>8</sup>	6,67x10 <sup>7</sup>	4,44x10 <sup>7</sup>	2,96x10 <sup>7</sup>	1,98x10 <sup>7</sup>	1,32x10 <sup>7</sup>	8,78x10 <sup>6</sup>	5,85x10 <sup>6</sup>	3,90x10 <sup>6</sup>	
BtMA	24h	0	0	0,55	1,11	0	0,55	1,11	1,11	0	0
25	48h	38,33	47,22	36,66	5,55	6,66	2,77	1,66	1,11	0	0
BtMA	24h	9,44	5,55	6,66	13,88	1,11	2,77	1,66	2,77	0,55	0
104	48h	55,55	17,22	25,00	28,88	5,55	5,55	15,00	3,33	1,11	0
BtMA	24h	100	99,44	96,11	73,33	29,44	4,44	0,55	0	0	0
401	48h	100	100	100	87,22	39,44	7,77	2,77	0	0	0
BtMA	24h	82,77	39,44	6,66	7,77	7,22	5,00	2,77	2,77	0	0
560	48h	91,11	56,66	27,22	41,66	19,44	13,88	12,77	5,00	0	0
<i>Bti</i> *	24h	100	100	100	100	98,3	96,6	95	86,6	61,6	0
	48h	100	100	100	100	100	100	100	90	75	0

**BtMA**= *Bacillus thuringiensis* do Maranhão (Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão - Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA);

\*Utilizada como linhagem padrão;

**Tabela 3-** Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Aedes aegypti* após 48 horas de aplicação.

Isolados	N	Inclinação ±DP	Dose (esporos- cristais/mL)	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	χ <sup>2</sup> (GL)
<i>Bti</i>	180	4.857±0.457*	0,32 x 10 <sup>7</sup>	0,32 (0,26-0,40) x 10 <sup>7</sup>	9.9448 (4)
BtMA 25	180	2.593±0.192*	0,73 x 10 <sup>8</sup>	0,73 (0,54.10 <sup>8</sup> -0,12.10 <sup>9</sup> )	26.795 (6)
BtMA 104	180	1.511±0.106*	0,84 x 10 <sup>8</sup>	0,84 (0,45.10 <sup>8</sup> -0,36.10 <sup>9</sup> )	39.194 (5)
BtMA 401	180	4.460±0.276*	4,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0 (3,4-4,7) x 10 <sup>4</sup>	2.5322 (2)
BtMA 560	180	3.073±0.181*	0,65 x 10 <sup>8</sup>	0,65 (0,46.10 <sup>8</sup> -0,12.10 <sup>9</sup> )	41.357 (4)

N - Número total de insetos testados/dose;

DP - Desvio Padrão;

IC - Intervalo de Confiança;

χ<sup>2</sup> - Qui-quadrado;

GL - Grau de Liberdade;

\* - Significativo (p ≤ 0,05).

**Tabela 4-** Genes detectados nos isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Maranhense e porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* após a realização dos bioensaios seletivos.

Isolados	Genes									Mortalidade (%)	
	<i>cry</i>					<i>cyt</i>			24hs	48hs	
	<i>cry4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cry10Aa</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa</i>	<i>cyt1Ab</i>	<i>cyt2Aa</i>			
BtMA 25	-	-	-	+	+	+	-	-	53,3	86,6	
BtMA 64	-	-	-	-	-	+	-	-	6,6	76,6	
BtMA 104	-	-	-	-	-	+	-	-	100	100	
BtMA 131	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	76,6	
BtMA 194	-	-	-	-	-	-	-	+	13,3	66,6	
BtMA 251	-	-	-	-	-	-	+	-	6,6	93,3	
BtMA 401	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	
BtMA 410	-	-	-	+	-	-	+	+	0	96,6	
BtMA 413	-	-	-	+	-	-	-	+	0	93,3	
BtMA 450	-	-	-	-	-	+	-	+	73,0	96,6	
BtMA 451	-	-	-	-	-	+	-	+	0	86,6	
BtMA 560	-	-	-	+	-	-	-	-	100	100	

(+) Apresentou amplificação para o gene; (-) não apresentou amplificação para o gene.