



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



Programa de Pós-graduação
em Biodiversidade,
Ambiente e Saúde

MARIA DOS REMÉDIOS ARAÚJO VIEIRA NETA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis*
BERLINER (1911) DA RESTINGA E MANGUE PARA O CONTROLE DE *Aedes*
aegypti (DIPTERA, CULICIDAE)**

CAXIAS/MA

2016

MARIA DOS REMÉDIOS ARAÚJO VIEIRA NETA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis*
BERLINER (1911) DA RESTINGA E MANGUE PARA O CONTROLE DE *Aedes*
aegypti (DIPTERA, CULICIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

ORIENTADORA: Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

CO-ORIENTADORA: Dra. Maria Cleoneide da Silva

CAXIAS/MA

2016

MARIA DOS REMÉDIOS ARAÚJO VIEIRA NETA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus thuringiensis*
BERLINER (1911) DA RESTINGA E MANGUE PARA O CONTROLE DE *Aedes*
aegypti (DIPTERA, CULICIDAE)

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Estudos Superiores de Caxias como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientadora: Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

Aprovado em: 28/07/2016

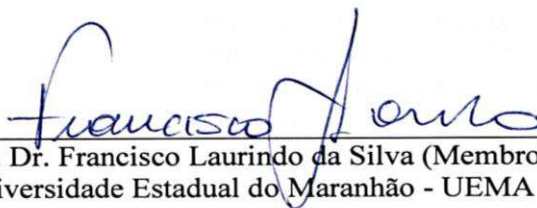
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



Profa. Dra. Flavia Castelo Branco Vidal (Membro)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA



Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva (Membro)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

As minhas filhas Emily e Emanuely razão do meu viver, a minha mãe Ana Lucia por todo amor incondicional, aos meus avós Maria dos Remédios e Raimundo Nonato (*in memoriam*), as minhas irmãs Luciana e Rayane e sobrinhas Monique, Sabrina, Nicole e Nayara pelos momentos de distração e felicidade nas horas difíceis.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde, força e coragem para superar as dificuldades e propor sempre um novo mundo de possibilidades;

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Ambiente e Saúde;

À Universidade Estadual do Maranhão especialmente ao Centro de Estudos Superiores de Caxias, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde;

À Capes (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e Fapema (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão) pela concessão da bolsa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), pelo financiamento dos projetos que são executados no Laboratório de Entomologia Médica-LABEM.

À Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro pela orientação e oportunidade, no laboratório, para realização das pesquisas que está tornando possível a execução deste trabalho;

À Co-orientadora Dra. Maria Cleoneide da Silva pela orientação e contribuição para a realização deste trabalho;

À Doutoranda Joelma Soares da Silva pela orientação e contribuição para a realização deste trabalho;

Ao INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) pela oportunidade de estágio e colaboração no projeto;

Ao Dr. Pedro Wanderli Tadei pela oportunidade no Laboratório de Malária e Dengue para concluir etapas do experimento;

Ao Laboratório de Genética Molecular – GENBIMOL, por permitirem o uso de alguns equipamentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa;

Aos amigos e colegas turma 2014.2 do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde;

A todos os meus amigos do Laboratório de Entomologia Médica-LABEM;

À Janaina Kelly, Ana Laísa, Ernesto Augusto, Juciane, Flávio, Sarah e Isabelle;

Aos amigos Domingos Lucas, Carmem Célia, Juliete Viana e Maxcilene;

As minhas filhas Emily Vitória e Emanuely Vitória razão do meu viver;

A Marcos Vinícios, José Ribamar e Maria Divina por cuidarem das minhas filhas;

À minha família (irmãs, sobrinhas, primas, primos e tios);

À minha mãe pelo amor, incentivo e apoio incondicional;

E a todos que fizeram parte direta ou indiretamente da minha formação.

*"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original".*

Albert Einstein

RESUMO

Bacillus thuringiensis é um entomopatígeno de insetos vetores e pragas, sua toxicidade está baseada no cristal proteico produzido durante a esporulação. Essa bactéria é muito utilizada no controle do *Aedes aegypti*, vetor de diferentes agentes etiológicos causadores de doenças no homem. A ação inseticida de *B. thuringiensis* ocorre quando as larvas ingerem os cristais proteicos que são dissolvidos em pH alcalino no intestino médio, liberando os fragmentos tóxicos que ligam-se a receptores específicos e provocam a morte das larvas. Visando a ação inseticida de *B. thuringiensis*, o presente estudo objetivou isolar linhagens de *B. thuringiensis* provenientes de solos de ecossistemas de restinga e mangue do estado do Maranhão com potencial tóxico para utilização no controle biológico de *A. aegypti*. Foram realizados bioensaios para determinar a atividade entomopatogênica do bacilo contra as larvas do *A. aegypti*, após os testes foi estimado a concentração letal mediana (CL₅₀ e CL₉₀). A Reação em Cadeia da Polimerase e a técnica de SDS-PAGE 12% foram realizadas para verificar o conteúdo gênico e proteico dos isolados, respectivamente. *B. thuringiensis* estava presente em 86,6% das amostras examinadas e o isolado BtMA-750 apresentou elevada toxicidade às larvas do *A. aegypti*, esse fato pode estar relacionado com a presença dos genes díptero-específicos (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*) e do gene *chi* que contribui para aumentar a ação inseticida da bactéria. Na técnica de SDS-PAGE 12% foi confirmado que as proteínas codificadas pelo genes estavam sendo expressas. Todos os isolados obtidos foram estocados no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão-BBENMA. Esses dados demonstram que o BtMA-750 tem potencial para ser utilizado para o controle biológico do *A. aegypti*.

Palavras-chave: Controle biológico. Bactéria. Vetor.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an entomopathogen of insect vectors and pests, their toxicity is based on the crystal protein produced during sporulation, this bacterium is widely used in controlling *Aedes aegypti* vector of different etiological agents of human disease. The insecticidal activity of *B. thuringiensis* occurs when the larvae ingest the protein crystals which are dissolved in alkaline pH in the midgut, releasing the toxic fragments that bind to specific receptors and cause the larvae death. Aiming to insecticidal *B. thuringiensis*, this study aimed to isolate strains of *B. thuringiensis* from sandbank ecosystems soil and Maranhão state swamp with toxic potential for use in biological control of *A. aegypti*. Bioassays were conducted to determine the entomopathogenic the *Bacillus* against the larvae of *A. aegypti*, after the tests was estimated median lethal concentration (LC₅₀ and LC₉₀). PCR tests (Polymerase Chain Reaction) and SDS-PAGE 12% technique were performed to verify the gene and protein content of the isolates, respectively. *B. thuringiensis* was present in 86.6% of the samples, the BTMA-750 isolate showed high toxicity against larvae of *A. aegypti*. This may be related to the presence of Diptera-specific genes (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1AB* and *cyt2Aa*) and *chi* gene which helps to increase the insecticidal bacterium action. The SDS-PAGE technique confirmed that the proteins encoded by the genes are being expressed. All isolates obtained were stored at the Bank of Bacilos entomopathogenic of Maranhao-BBENMA. These data demonstrate that the BtMA-750 has the potential to be used for the biological control of *A. aegypti*.

Palavras-chave: Biological control. Bacterium. Vector.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão de uma sessão longitudinal de *Bacillus thuringiensis* em final de esporulação, mostrando o esporo (A) e as toxinas com propriedades inseticidas (B). Foto: Institut Pasteur.....18
- Figura 2. Mapa dos pontos de coletas de solo nos ecossistemas restinga e mangue do estado do Maranhão para isolamento de *Bacillus thuringiensis*.....23
- Figura 3. Fitas de papel filtro impregnadas com suspensão esporos/cristal de *Bacillus thuringiensis* armazenados em microtubos (A), estoque dos microtubos em caixas plásticas (B), isolados depositados no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (C).....25
- Figura 4. Ovos de *Aedes aegypti* armazenados em papel filtro (A), bacia com ovos para eclosão das larvas (B), larvas (C), gaiola de manutenção para mosquitos adultos (D).....26
- Figura 5. Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Aedes aegypti* durante a realização de um bioensaio seletivo27
- Figura 6. Perfis de PCR gerados do material genético do isolado de *Bacillus thuringiensis* BtMA-750 da restinga amplificados com a utilização dos iniciadores: *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba* e *cry10Aa*. CP: controle positivo; CN: controle negativo; MM: marcador molecular (1 Kb DNA Ladder)35
- Figura 7. Perfis de PCR gerados do material genético do isolado de *Bacillus thuringiensis* BtMA-750 da restinga amplificados com a utilização dos iniciadores: *cry4Aa*, *cry4Ba*.CP: controle positivo; CN: controle negativo; MM: marcador molecular (1 Kb DNA Ladder).....35
- Figura 8. Perfis de PCR gerados do material genético do isolado de *Bacillus thuringiensis* BtMA-750 da restinga amplificados com a utilização do iniciador: *chi*. CP: controle positivo; CN: controle negativo; MM: marcador molecular (1 Kb DNA Ladder)36
- Figura 9. Padrão de massas moleculares obtida a partir de SDS-PAGE 12% para análise das proteínas do isolado BtMA-750. MM.: marcador molecular; *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) T14 00137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ecossistemas e Municípios onde foram coletadas amostras de solos para o isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
Tabela 2. Alíquotas utilizadas na realização dos bioensaios a partir da amostra liofilizada do isolado BtMA-750	29
Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para identificação dos genes <i>cry</i> , <i>cyt</i> e <i>chi</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> com ação específica para <i>Aedes aegypti</i> , com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado	30
Tabela 4. Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> obtidos a partir de amostras de solo dos ecossistemas restinga e mangue em três municípios do estado do Maranhão.....	33
Tabela 5. Suscetibilidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao isolado BtMA-750, proveniente da restinga, Maranhão	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

± - mais ou menos

1 U – 1 Unidade

AN – Ágar nutriente

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

CHIKV – Vírus chikungunya

CL₅₀ – Concentração Letal capaz de matar 50%

CL₉₀ – Concentração Letal capaz de matar 90%

cm – Centímetro

Cry – Proteína cristal

Cyt – Proteína citolítica

DENV – Vírus dengue

dNTP – Deoxynucleotide

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FeSO₄ – Sulfato de Ferro

g – Grama

h - Hora

H₂O – Água

M - Molar

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

min. – Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MnSO₄ – Sulfato de Manganês

NaCl – Cloreto de Sódio

nBt – Número de colônias de *Bacillus thuringiensis*

nCB - Número de colônias bacterianas

ng - Nanograma

° C – Graus Celsius

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMSF - Fenilmetilsulfonil fluoride

rpm – Rotação por minuto

s – Segundo

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TBE – Tris/Borato/EDTA

Tris-HCl – Cloridrato de trizma

V - Volts

xg- Força centrífuga relativa

ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

β - Beta

δ – Delta

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus 1967)	15
1.2 Arboviroses transmitidas pelo <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	16
1.3 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	16
1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
1.5 Ecossistemas: restinga e mangue.....	19
1.6 Caracterização do problema	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Coletas de solos	23
3.2 Isolamento e identificação de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
3.3 Armazenamento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
3.4 Manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório	26
3.5 Bioensaios.....	27
3.5.1 Bioensaios de susceptibilidade.....	27
3.5.2 Bioensaios quantitativos	28
3.6 Análise Estatística.....	29
3.7 Caracterização molecular.....	29
3.7.1 Extração de DNA genômico	29
3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	30
3.7.3 Eletroforese em gel de agarose a 1%	31
3.8 Caracterização proteica.....	31
3.8.1 Extração de Proteínas.....	31
3.8.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).....	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Isolamento e identificação de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
4.2 Bioensaios de susceptibilidade.....	34
4.3 Bioensaios quantitativos.....	34
4.4 Detecção dos genes <i>cry</i> , <i>cyt</i> e <i>chi</i> por PCR.....	34
4.5 Perfil proteico do BtMA-750	36
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1967)

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus 1762) é oriundo do Velho Mundo, descrito pela primeira vez no Egito, pertence ao filo Artropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*, espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; CHIARAVALLOTI-NETO, 1997; FORATTINI, 2002; MONTEIRO, 2014). É considerado um mosquito cosmopolita que apresenta comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico (FORATTINI, 2002; NATAL, 2002), encontrado em regiões tropicais e subtropicais, limitadas entre os paralelos de latitudes 42° Norte e 40° Sul (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

O mosquito desenvolve-se por holometabolia, passando pelas fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Seu desenvolvimento completa-se de 8 a 12 dias e a longevidade dos mosquitos adultos, e em média, 30 dias (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; ZETTEL; KAUFMAN, 2013). Os machos e as fêmeas alimentam-se de fluidos açucarados de plantas, porém somente as fêmeas são hematófagas, e durante este processo obtém proteínas para maturação dos ovos (FORATTINI, 2002).

As fêmeas de *A. aegypti* realizam a oviposição em uma diversidade de depósitos artificiais que acumulam água e estão localizados em diferentes locais, esse é um dos principais fatores de distribuição e dispersão do mosquito (TILAK et al., 2005; BESERRA et al., 2009; MARQUES et al., 2013).

Os ovos do mosquito apresentam alta capacidade de resistência à dessecação, e podem manter-se viáveis por até 450 dias (TAUIL, 2002). Após, formação completa do embrião, os ovos amadurecem e, quando entram em contato com a água, começa o processo de eclosão das larvas, que são filtradoras seletivas e raspadoras de superfície (FORATTINI, 2002).

A fase larvária, período de alimentação e crescimento do mosquito, depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro. Esta fase pode durar cerca de 5 dias. Após esse período as larvas entram no estágio de pupação, nesta fase não se alimentam, e ocorre a metamorfose do estágio larval para o alado (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002; FORATTINI, 2002).

1.2 Arboviroses transmitidas pelo *Aedes (Stegomyia) aegypti*

O *A. aegypti* é vetor de diversos agentes etiológicos, causadores de doenças ao homem, como dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e vírus Zika (ZIKV), são vírus transmitidos pela picada das fêmeas do mosquito (HONÓRIO et al., 2015; VASCONCELOS, 2015; ZARA et al., 2016). Atualmente essas arboviroses são umas das maiores problemáticas em saúde pública no país, em vista do elevado número de casos registrados pelo Ministério da Saúde (BRASIL/SVS/MS, 2016).

O vírus DENV, pertencente à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos distintos, são eles: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER; CLARK, 1995; WHO, 2015). A dengue é considerada um crescente problema de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais, estima-se que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão em risco de infecção com o vírus da dengue (PAHO, 2015; WHO, 2015). Entre os meses de janeiro a maio de 2016 foram registrados 1.294.583 casos prováveis de dengue no país. A região Nordeste foi a segunda região que apresentou o maior número de casos notificados com 264.438, com incidência de 467,5% por 100 mil habitantes (BRASIL/SVS/MS, 2016).

A febre chikungunya é causada por um *Alphavirus* da família Togaviridae (PIALOUX et al., 2007; DONALISIO; FREITAS, 2015). Entre os meses de janeiro a maio de 2016, no país, foram confirmados 30.315 casos. A região nordeste apresentou maior incidência: 188,7% casos por 100 mil habitantes (BRASIL/SVS/MS, 2016).

O vírus Zika é um *Flavivirus* da família Flaviviridae (VASCONCELOS, 2015). Neste ano, 64.311 casos de febre causada pelo vírus Zika foram confirmados, destes, a região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência com 159,8% casos por 100 mil habitantes.

1.3 Controle do *Aedes aegypti*

O controle químico com inseticidas vem sendo utilizado desde o século XIX e diversas substâncias químicas de origem orgânica ou inorgânica já foram empregadas na tentativa de controlar populações desse vetor (BRAGA; VALLE, 2007; LIMA et al., 2009).

Dentre os inseticidas químicos encontram-se os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (CAMPOS; ANDRADE, 2001; BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2006; BESERRA et al., 2007; BRAGA; VALLE, 2007; MARTINS et al., 2009; MARCOMBE et al., 2012). Esses inseticidas apresentam toxicidade para os mamíferos, podem contaminar o meio ambiente, além de contribuírem para o aparecimento de populações

de mosquitos resistentes acarretando problemas para o controle de vetores (WHO, 1979; MARCORIS et al., 1999; ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003; BRAGA; VALLE, 2007).

O desenvolvimento da resistência pelas populações de *A. aegypti* aos inseticidas é a principal problemática que afeta as estratégias de controle do vetor (LAZCANO et al., 2009). Por isso, tornou-se necessária a procura por métodos alternativos para redução dos índices populacionais dos vetores, como o uso de controle biológico, que consiste na regulação da densidade populacional de determinada espécie, por meio do emprego de microrganismos capazes de provocar doenças em insetos vetores (FORATTINI, 2002; FINKLER, 2011, 2012; MAIA; DIREITO; FIGUEIRÓ, 2014).

Diversos microrganismos como fungos, parasitoides, vírus e bactérias são utilizados no controle de insetos pragas e vetores (ALMEIDA; FILHO, 2001; SIMONATO; GRIGOLLI; OLIVEIRA, 2014). As bactérias entomopatogênicas são as mais utilizadas mundialmente no controle de vetores. O *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) (Eubacteriales, Bacillaceae) é a espécie mais estudada e usada no controle microbiano, por serem específicas e apresentarem elevada virulência devido à produção de toxinas, além de serem inócuas ao homem (ALVES, 1998).

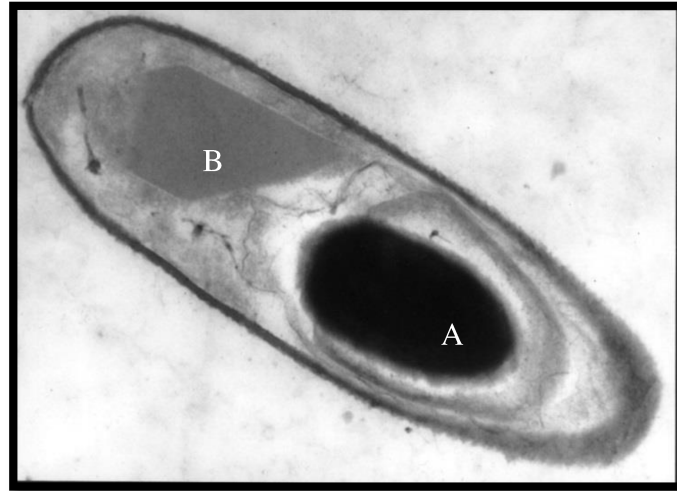
1.4 *Bacillus thuringiensis*

Em 1911 Berliner isolou uma bactéria, causando doença e morte em larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller 1879) (Lepidoptera, Pyralidae), posteriormente em 1915 Berliner descreveu e nomeou esta bactéria de *B. thuringiensis* em homenagem à província da Thuringiana na Alemanha, onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (HABIB; ANDRADE, 1998; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Bacillus thuringiensis possui forma de bastonete de 1 a 1,2 µm 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 (HABIB; ANDRADE, 1998).

Durante a fase de esporulação a bactéria produz proteínas com atividade inseticida, essas proteínas acumuladas formam os cristais proteicos, os quais são formados por δ-endotoxinas ou proteínas Cry e Cyt (SOBERÓN; BRAVO, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão de uma sessão longitudinal de *Bacillus thuringiensis* em final de esporulação, mostrando o esporo (A) e as toxinas com propriedades inseticidas (B). Foto: Institut Pasteur.



Fonte: Sanchis e Bourguet (2008).

As proteínas Cry apresentam ação inseticida específica, diferente das Cyt que expressam atividade citolítica inespecífica (AGAISSÉ; LERECLUS, 1995; ALVES, 1998). Essas proteínas são codificadas por genes *cry*, que podem estar localizados tanto no cromossomo como em plasmídeos. Muitos isolados de *B. thuringiensis* apresentam diversos genes *cry* responsáveis pela expressão de diferentes proteínas com ação inseticida (BRAVO, 1997; PINTO; BERLITZ; CASTILHOS-FORTES; FIUZA, 2010), contra insetos de diversas ordens como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera entre outros (VAN FRANKENHUYZEN; NYSTROM, 2016).

As proteínas do cristal não apresentam ação tóxica sendo consideradas como pró-toxinas (toxina inativa). Essas proteínas tornam-se tóxicas quando são solubilizadas em pH alcalino no intestino médio de insetos susceptíveis, a partir dessa dissolução as pró-toxinas são liberadas no intestino das larvas que na presença de proteases são convertidas em polipeptídios tóxicos. As toxinas ativas ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, formando poros e desestabilizando os gradientes osmóticos e iônico, fazendo com que este cesse a alimentação, morrendo por inanição ou septicemia (HABIB; ANDRADE, 1998; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; ARONSON; SHAI, 2001; FIUZA, 2009, 2010).

As toxinas Cyt (citolíticas) apresentam geralmente menor atividade tóxica que as Cry (MANASHEROB et al., 2006; OTIENO-AYAYA et al., 2008; HERNÁNDEZ-SOTO et

al., 2009), entretanto, agem sinergicamente com as toxinas Cry, servindo como receptores para essas toxinas (CRICKMORE et al., 1995; PONCET et al., 1995).

São conhecidas 22 genes que codificam as toxinas com ação entomopatogênica para o *A. aegypti* como, *cry1Ab*, *cry1Ca*, *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cry11Bb*, *cry16Aa*, *cry20Aa*, *cry24Ca*, *cry30Fa*, *cry32Ba*, *cry32Ca*, *cry32Da*, *cry44Aa*, *cry54Aa*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt1Ba*, *cyt2Aa*, *cyt2Ba*, *cyt2Bc* (VAN FRANKENHUYZEN; NYSTROM, 2016).

A caracterização dos genes *cry* é importante para a diferenciação de toxicidade específica das proteínas Cry (SCHÜNEMANN; KNAACK; FIUZA, 2014). A detecção de diferentes genes de *B. thuringiensis* pode ser realizada por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), uma ferramenta molecular amplamente utilizada para caracterizar o *B. thuringiensis* (KONECKA et al., 2012; SHISHIR et al., 2014). A PCR pode ser utilizada para amplificar regiões específicas do DNA e, portanto, determinar a presença ou ausência de um gene alvo. A identificação dos genes pode prever parcialmente a ação inseticida de uma dada linhagem (LIMA et al., 2002; PORCAR; JUARÉZ-PÉREZ, 2003).

Além das δ -endotoxinas o *B. thuringiensis* apresenta outros mecanismos de toxicidade, como a produção da enzima quitinase, que podem potencializar ação inseticida do *B. thuringiensis*, pois essa exoenzima interrompe a integridade da membrana e facilita a inserção das toxinas Cry a receptores no epitélio intestinal (REGEV et al., 1996; NI et al., 2015). Alguns trabalhos têm sido realizados visando à clonagem dos genes quitinase em *Escherichia coli* de maneira a comprovar seu efeito sinérgico com as toxinas Cry (ZHONG et al., 2005; NI et al., 2015).

1.5 Ecossistemas: restinga e mangue

O *B. thuringiensis* é considerado um organismo ubíquo podendo ser isolada de solo (RAMBERSAD; AMMONS, 2005; AMMOUNEH et al., 2011; SOARES-DA-SILVA et al., 2015), filoplano de espécies vegetais (SMITH; COUCHE, 1991; HANSEN et al., 1998; BLANC; KAELIN; GADANI, 2002), insetos vivos ou mortos e seus habitats (ASOKAN; PUTTASWAMY, 2007), grãos estocados (MEADOWS et al., 1992; BERNHARD et al., 1997), a partir de amostras de água (IRIARTE et al., 2000) e sedimentos marinhos (MAEDA et al., 2001).

Na região Nordeste do Brasil, alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter isolados de *B. thuringiensis* de solo com atividade entomopatogênica (SILVA; DIAS; MONNERAT, 2002; VALICENTE; BARRETO, 2003). No entanto, esses trabalhos

têm sido muito restritos a *Bacillus* com atividade a pragas agrícolas (VALICENTE; BARRETO, 2003; POLANCZYK et al., 2004; VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004; SILVA et al., 2012), com poucos trabalhos direcionados a busca de isolados ativos a insetos vetores de doenças (REGIS et al., 2000; MEDEIROS et al., 2005; ARAÚJO et al., 2007).

O estado do Maranhão por ser formado por uma grande diversidade de ecossistemas, pode apresentar um alto potencial em conter linhagens de *B. thuringiensis* com elevada atividade entomopatogênica a vetores de doenças. O Estado apresenta uma Planície Costeira com aproximadamente 640 km (BANDEIRA, 2013), com predomínio de mangue e, em determinadas áreas, uma vasta vegetação de restinga.

Alguns trabalhos como Maeda et al. (2001) no Japão, Geetha (2007) na Índia, Marcon et al. (2014) no Brasil têm demonstrado a existência de *B. thuringiensis* no ecossistema de mangue. Baig e Mehnaz (2010) também isolaram esta bactéria em sedimentos marinhos da área de Hawks Bay de Cape Mount ao longo do mar Arábico.

1.6 Caracterização do problema

As arboviroses provocadas pelos vírus DENV, CHIKV e ZIKV que são transmitidos ao homem pelo *A. aegypti*, acometem milhares de brasileiros (BRASIL/SVS/MS, 2016). A única forma de reduzir os casos dessas doenças é controlar as populações do *A. aegypti*, pois até o momento não existe vacina disponível no mercado contra nenhuma destas doenças (TAUIL, 2002; DONALISIO; FREITAS, 2015; WHO, 2015).

Uma alternativa viável para o controle das populações do mosquito é o uso de formulados à base de *Bacillus thuringiensis israelenses* (*Bti*), que são eficientes para o controle da fase larval do vetor, entretanto, a maioria destes formulados é importado o que provoca aumento do preço final para o consumidor e a diminuição da competição destes produtos em relação aos inseticidas químicos (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Considerando, o elevado custo de formulados a base do *Bti*, faz-se necessário a busca por novas linhagens de *B. thuringiensis* que estejam adaptadas às condições locais de cada região e apresentem maior variabilidade genética em relação às linhagens de *B. thuringiensis* já descritas (CRICKMORE et al., 2016; VAN FRANKENHUYZEN; NYSTROM, 2016), pois apesar de não ser comprovada resistência em populações do *A. aegypti* às toxinas produzidas pela estirpe *Bti*, estudos demonstram que populações desse vetor apresentam potencial em desenvolver resistência a estas toxinas quando testadas

isoladamente (PÉREZ et al., 2005; CADAVID-RESTREPO; SAHAZA; ORDUZ, 2012; TETREAU et al., 2013) .

Portanto, com base nesse contexto, acredita-se que o solo dos ecossistemas de restinga e mangue no Maranhão pode conter linhagens de *B. thuringiensis* com alta atividade inseticida e que possam ser utilizadas para a fabricação de produtos biológicos com recursos naturais próprios da região estudada, alta eficiência e baixo custo, uma vez que preço é um determinante na opção pelo produto (ALVES; FILHO, 1998; PINTO et al., 2003; GOBATTO et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter novas linhagens de *Bacillus thuringiensis* provenientes de solos dos ecossistemas restinga e mangue do Estado do Maranhão com potencial larvicida para o controle biológico de *Aedes aegypti*.

2.2 Específicos

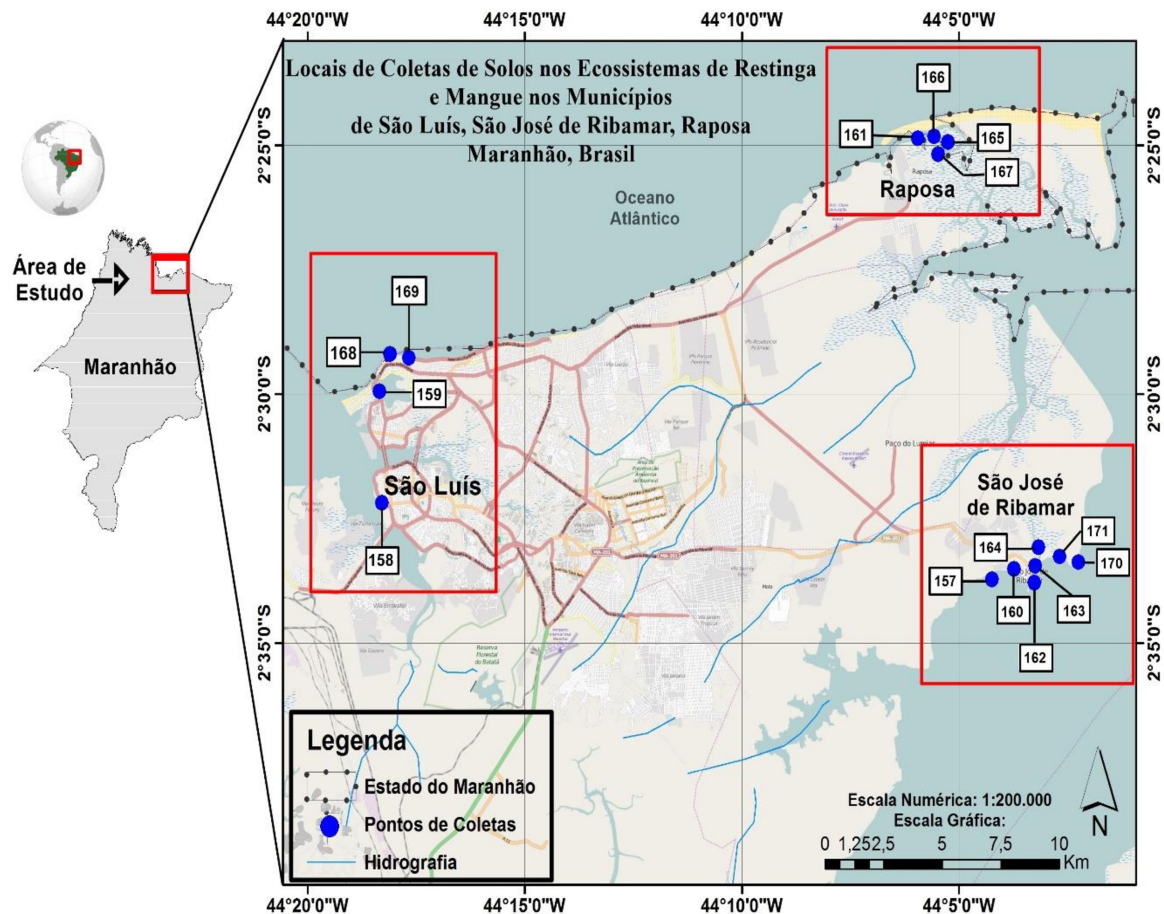
- Isolar *B. thuringiensis* em amostras de solo da restinga e mangue do Maranhão;
- Avaliar o potencial larvicida das linhagens de *B. thuringiensis* selecionadas em larvas de *A. aegypti*, com a determinação da Concentração Letal Mediana (CL₅₀ e CL₉₀);
- Comparar a toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* do estado do Maranhão com a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) T14 001, por meio de bioensaios com *A. aegypti*;
- Caracterizar o conteúdo gênico e proteico (*cry*, *cyt* e *chi*) das linhagens de *B. thuringiensis* com ação tóxica para larvas de *A. aegypti*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas de solos

Para o isolamento de *B. thuringiensis* foram coletadas 15 amostras de solos provenientes de três municípios, oriundas dos ecossistemas restinga e mangue do estado do Maranhão. Os pontos de coleta das amostras estão geograficamente esquematizados na (Figura 2).

Figura 2. Mapa dos pontos de coletas de solo nos ecossistemas restinga e mangue do estado do Maranhão para isolamento de *Bacillus thuringiensis*.



As amostras de solo foram coletadas 5 cm abaixo da superfície, sendo coletado para cada amostra aproximadamente 10 g de solo, com auxílio de uma espátula de madeira estéril, colocada em tubos Falcon de 15 mL estéreis. Cada amostra foi identificada quanto à localidade de coleta e o local georeferenciado por meio de aparelho GPS modelo eTrex vista HCx (Garmin) (Tabela 1).

Posteriormente, as amostras de solo foram acondicionadas em uma caixa de isopor e transportadas ao Laboratório de Entomologia Médica – LABEM, localizado na Universidade Estadual do Maranhão em Caxias (CESC-UEMA).

Tabela 1. Ecossistemas e Municípios onde foram coletadas amostras de solos para o isolamento de *Bacillus thuringiensis*.

Ecossistema	Municípios	Número da amostra
Restinga	São José de Ribamar	157
	São José de Ribamar	158
	São José de Ribamar	159
	São José de Ribamar	160
	São José de Ribamar	161
	São Luís	164
	São Luís	165
	São Luís	166
	Mangue	São José de Ribamar
São José de Ribamar		163
São Luís		167
Raposa		168
Raposa		169
Raposa		170
Raposa		171

3.2 Isolamento e identificação de *Bacillus thuringiensis*

O isolamento seguiu o protocolo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1985), que consiste em misturar 1 g de solo de cada amostra à 10 mL de solução de sais (0,006 mM FeSO₄.7H₂O; 0,01 mM CaCO₃. 7H₂O; 0,08 mM MgSO₄.7H₂O; 0,07 mM MnSO₄.7H₂O; 0,006 mM ZnSO₄.7H₂O).

Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente (10⁻¹ e 10⁻²) em solução salina (NaCl a 1%). Posteriormente uma alíquota de 1 mL da última diluição foi homogeneizada em agitador de tubos vortex e submetida a choque térmico a 80 °C por 12 min em banho-maria e em gelo por 5 min. Após, 100 µL da solução foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (AN) (*Himedia*) (peptona 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L e ágar 15 g/L), sendo posteriormente espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram invertidas e armazenadas em estufa bacteriológica a 28 °C, durante 48 h para o crescimento das colônias bacterianas.

Após o crescimento, as colônias foram avaliadas quanto à morfologia (forma, bordo, elevação, estrutura, tamanho e coloração) (RAMPERSAD; KHAN; AMMONS, 2002)

e aquelas que apresentaram características típicas de *Bacillus* spp. foram submetidas ao teste de Gram (*Newprov*). As colônias gram-positivas foram repicadas em meio AN contendo penicilina G a 1% e incubadas em estufa bacteriológica por 48 h, posteriormente foram visualizadas sob microscopia de contraste de fase (aumento de 1000x) para verificar a presença de inclusões paraesporais (cristais de proteínas).

Os isolados identificados como *B. thuringiensis* foram depositados no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão – BBENMA, no Laboratório de Entomologia Médica do CESC/UEMA. Para cada isolado identificado foi gerado um código, formado por quatro letras (BtMA: Bt - *Bacillus thuringiensis* e MA - Maranhão) acrescido do número, que corresponde a sequência do seu armazenamento no Banco.

3.3 Armazenamento de *Bacillus thuringiensis*

Os isolados estão armazenados de acordo com o método descrito por Monnerat, Silva e Silva-Werneck (2001) e Costa et al., 2010. Cada isolado foi semeado em placa de Petri contendo meio de cultura AN, incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 5 dias, para a completa esporulação. Posteriormente 1 mL de água *milli-Q* foi acrescentado sobre as placas de Petri contendo os isolados de *B. thuringiensis*, os quais foram homogeneizados, com auxílio de alça de Drigalski. Esta solução de esporos/cristais foi utilizada para impregnar fitas de papel filtro (1,5 cm X 0,5 cm) e, posteriormente, estas foram depositadas em microtubos de 2 mL em triplicatas e armazenados a 4 °C (Figura 3).

Figura 3. Fitas de papel filtro impregnadas com suspensão esporos/cristal de *Bacillus thuringiensis* armazenados em microtubos (A), estoque dos microtubos em caixas plásticas (B), isolados depositados no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (C).



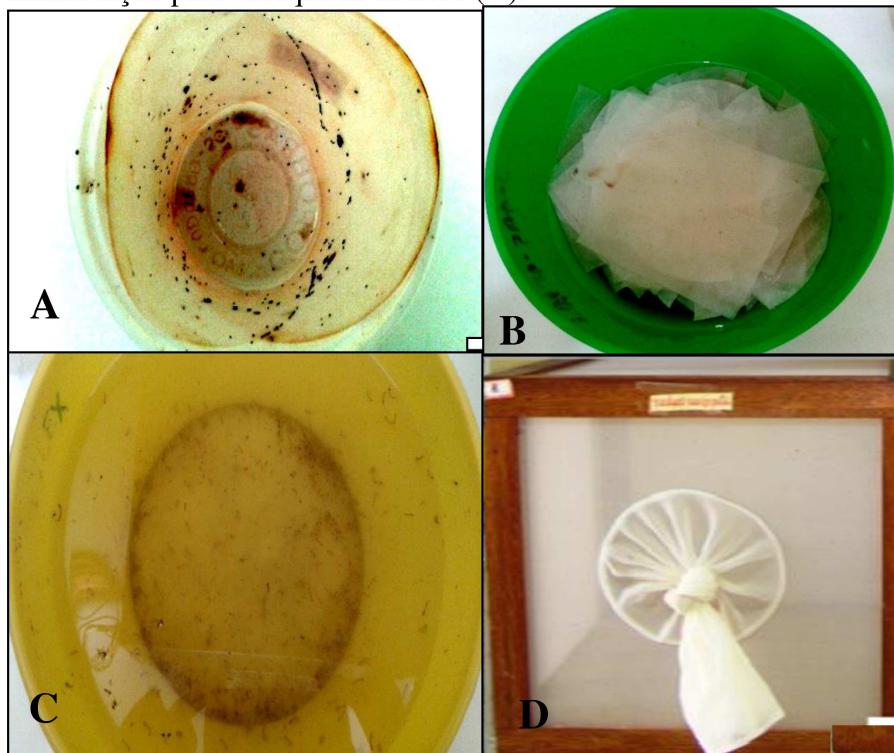
Fonte: Acervo do Labem

3.4 Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório

A criação de *A. aegypti* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) adaptado por Pinheiro e Tadei (2002). Os ovos de *A. aegypti* armazenados em papel-filtro (Figura 4A) foram colocados para eclosão das larvas em bacias de plástico contendo 500 mL de água (Figura 4B). Após a eclosão, as larvas receberam alimento, que consiste na mistura de ração de peixe. Todos os dias foi realizada a limpeza das bacias para evitar a formação de película na superfície e a proliferação de microrganismos.

As larvas foram mantidas nas bacias até atingir o 3º instar (Figura 4C), quando foram selecionadas para os bioensaios, sendo as demais deixadas nas bacias até atingirem o estágio de pupa, sendo então transferidas para as gaiolas, teladas, para a emergência dos alados (Figura 4D).

Figura 4. Ovos de *Aedes aegypti* armazenados em papel filtro (A), bacia com ovos para eclosão das larvas (B), larvas (C), gaiola de manutenção para mosquitos adultos (D).



Fonte: Acervo do Labem.

3.5 Bioensaios

3.5.1 Bioensaios de susceptibilidade

Os bioensaios foram realizados segundo o protocolo preconizado por Dulmage et al. (1990). Testou-se 100 isolados (50 isolados provenientes do ecossistema restinga e 50 do ecossistema mangue), cultivados em meio T3 líquido em Erlenmeyer à 28 °C e 180 rpm, por cinco dias em *shaker* (Novatécnica), em seguida, foram preparadas, duas suspensões seriadas, 10^{-1} e 10^{-2} . A suspensão 10^{-2} foi utilizada para a contagem de esporos em microscópio óptico, com o auxílio de câmara de Neubauer (ALVES; MORAES, 1998) para padronização à concentração de 1×10^8 esporos-cristal/mL, em volume final de 10 mL.

Para cada isolado preparou-se réplicas de três copos plásticos (50 mL) contendo 10 larvas de 3° instar de *A. aegypti*, 10 mL da suspensão esporos-cristal/mL na concentração de 1×10^8 (Figura 5). Como controle negativo, em cada bioensaio preparou-se uma réplica sem a suspensão de esporos/cristais. Para o controle positivo foi utilizada a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) T14 001 (cedida pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Unidade da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho) nas mesmas condições dos isolados. Após a aplicação do bacilo realizou-se as leituras de sobrevivência das larvas em intervalos de tempo de 24 e 48 h (WHO, 2005). Os isolados que apresentaram 100% de mortalidade foram testados em bioensaios quantitativos.

Figura 5. Disposição dos copos plásticos contendo larvas de *Aedes aegypti* durante a realização de um bioensaio seletivo.



Fonte: Acervo do Labem

3.5.2 Bioensaios quantitativos

Dos 100 isolados testados nos bioensaios de susceptibilidade apenas um isolado proporcionou 100% de mortalidade às larvas de *A. aegypti*. Esse isolado foi testado em bioensaios quantitativos para a determinação da CL₅₀ (concentração capaz de matar 50% das larvas expostas ao isolado) e CL₉₀ (concentração capaz de matar 90% das larvas expostas ao isolado), cuja finalidade é determinar a toxicidade do isolado contra larvas do *A. aegypti*.

Esse isolado foi cultivado em 12 placas de Petri contendo meio de cultura AN e incubado em estufa bacteriológica a 28 °C por 24 h. Posteriormente, foi transferido para Erlenmeyer, com auxílio de alça de platina esterilizada e cultivado em 600 mL do meio de cultura NYSM (YOUSTEN, 1984) por 5 dias a 28 °C *shaker* sob a agitação de 180 rpm, para a completa esporulação das bactérias e liberação dos cristais. A cultura obtida foi liofilizada, seguindo a metodologia de Santos et al. (2012), com algumas modificações, sendo centrifugada a 9.000 xg por 30 min a 4 °C, lavada com água destilada autoclavada, em seguida congelada por 14 h e liofilizada por aproximadamente 6 h em liofilizador Enterprise I (*Terroni*) no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Os bioensaios quantitativos foram realizados seguindo o protocolo de WHO (2005), que consistiu na preparação de duas soluções seriadas a partir do isolado liofilizado nas concentrações de 5 mg/mL (solução I) e 0,05 mg/mL (solução II). A partir da solução II foram preparadas dez concentrações (Tabela 2) da suspensão do isolado de *B. thuringiensis* para realização dos bioensaios, que foram feitos em cinco réplicas, para cada concentração, em volume final de 150 mL de água e 20 larvas de *A. aegypti* de 3º instar, sendo repetido três vezes. A estirpe padrão *Bti* T14 001 foi utilizada como controle positivo nas mesmas condições descritas para o isolado e, como controle negativo os copos continham apenas água tritonada (0,01%). Após a aplicação do bacilo realizou-se as leituras de sobrevivência das larvas em intervalos de tempo de 24 e 48 h.

Tabela 2. Alíquotas utilizadas na realização dos bioensaios a partir da amostra liofilizada do isolado BtMA-750

Total de concentrações	Alíquota (µL) (solução II)	Concentração final de bacilos no recipiente (mg/mL)
1	120	4×10^5
2	90	3×10^5
3	60	2×10^5
4	30	1×10^5
5	24	$0,8 \times 10^5$
6	15	$0,5 \times 10^5$
7	12	$0,4 \times 10^5$
8	9	$0,3 \times 10^5$
9	6	$0,2 \times 10^5$
10	3	$0,1 \times 10^5$

3.6 Análise estatística

O índice de *B. thuringiensis* foi calculado com a utilização da fórmula (nBt/nCB) que corresponde ao número isolados obtidos em relação ao número de total de colônias bacterianas observadas em cada amostra (HOSSAIN et al., 1997).

Os dados de mortalidade e percentagem de larvas vivas foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925), após esta correção os dados foram submetidos à análise de Probit a $P < 0,05$ (FINNEY, 1971) através do programa estatístico POLO-PLUS (LeOra Software 2003) para determinação da CL_{50} e CL_{90} .

3.7 Caracterização molecular

3.7.1 Extração de DNA genômico

Na extração do DNA genômico do isolado (o que ocasionou 100% de mortalidade às larvas de *A. aegypti*) foi utilizado a Matriz InstaGene (Bio-Rad), seguindo o protocolo do fabricante, o qual foi previamente cultivado em placa de Petri contendo meio AN sólido, por 18 h a 28 °C em estufa bacteriológica. Uma colônia do isolado foi ressuspensa em 1 mL de água *milli-Q* em microtubos e levados a centrifugação por 1 min a 12.000 rpm a 25 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, 100 µL da matriz foi adicionado ao sedimento e, em seguida, incubado em banho-maria a 56 °C durante 25 min e após agitado em vortex por 10 s. Posteriormente, o microtubo foi colocado em banho-maria a 100 °C por 8 min, novamente agitado em vortex por 10 s, e por fim, centrifugado a 12.000 rpm por 2,5 min. O sobrenadante foi transferido para microtubos, quantificado em espectrofotômetro L-Quant (*Loccus*) no Laboratório de Genética Molecular (GENBIMOL) e armazenado a -20° C para a utilização nas reações de PCR.

3.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O isolado que ocasionou 100% de mortalidade às larvas de *A. aegypti* foi submetido a técnica de PCR para a detecção dos genes *cry*, *cyt* e *chi* que codifica toxinas com ação inseticida específica para mosquitos (Tabela 3).

As reações foram conduzidas em um volume final de 25 µl, constituído de 1x do tampão (GoTaq® Flexi DNA Polymerase) (Promega), 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP 0,1 mM de cada *Primer*, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 50 ng de DNA e água *milli-Q*. O DNA padrão *Bti* foi utilizado como controle positivo e como controle negativo a quantidade de DNA foi substituída por água *milli-Q*.

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para identificação dos genes *cry*, *cyt* e *chi* de *Bacillus thuringiensis* com ação específica para *Aedes aegypti*, com suas respectivas sequências e tamanho de fragmento esperado

Genes Iniciadores		Sequências (5'-3')	Tam. Pb ¹	T° Ane. ²
δ-endotoxinas	Classe Cry ³	<i>cry4Aa</i> * 5'-GGGTATGGCACTCAACCCCACTT 3'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	777	50
		<i>cry4Ba</i> * 5'-GAGAACACACCTAATCAACCAAT 3'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	347	52
		<i>cry10Aa</i> * 5'-ATTGTTGGAGTTAGTGCAGG 3'-AATACTTTGGATGTGTCTTGAG	995	48
		<i>cry11Aa</i> * 5'-CCGAACCTACTATTGCGCCA 3'-CTCCCTGCTAGGATTCCGTC	470	50
		<i>cry11Ba</i> * 5'-CCGAACCTACTATTGCGCCA 3'-CTCCCTGCTAGGATTCCGTC	608	52
	Classe Cyt ⁴	<i>cyt1Aa</i> * 5'-AACTCAAACGAATAACCAAG 3'-TGTTCCCTTACTGCTGATAC	300	53
		<i>cyt1Ab</i> * 5'-AAGCAAGGGTTATTACATTACG 3'-CCAATACTAAGATCAGAGGG	698	54
		<i>cyt2Aa</i> * 5'-GCATTAGGAAGACCATTG 3'-AAGGCTAAGAGTTGATATCG	361	53
Exotoxina	<i>chi</i> [#] 5' – ATGGTCATGAGGTCTC 3' – CTATTTCGCTAATGAGC	2027	45	

¹Tam. pb tamanho de pares de base; ²T° Ane.: temperatura de anelamento; ³Cry: crystal; ⁴Cyt: cytolitic.*Primers desenhados por Costa et al. (2010); #Primer desenhado por Lin (2004)

A amplificação dos genes foi realizada em termociclador (*Gencycler-G96G*). Para os genes *cry* e *cyt* seguiu-se as condições de temperatura de: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C para desnaturação, 30 s de 50 °C a 53 °C para o anelamento dos iniciadores e a 72 °C por 1 min para extensão; um passo final a 72 °C por 7

min para completa extensão. Para o gene quitinase (*chi*) foram as seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 1 min à 94 °C para desnaturação, 1 min à 45 °C para anelamento dos iniciadores, e a 72 °C por 1,5 min para extensão, um passo final a 72 °C por de 10 min para a completa extensão.

3.7.3 Eletroforese em gel de agarose a 1%

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA gerados pela técnica de PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a reação de amplificação, 3 µL de cada amostra foi adicionado em 3 µL do tampão de carregamento *Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega)*. As amostras foram aplicadas no gel de agarose a 1%, sendo estes submetidos a um campo elétrico de 90 V, conduzido em tampão TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) em pH alcalino.

Em cada reação de eletroforese 3 µL de DNA *Ladder 1Kb (Promega)* foi adicionado em 3 µL do tampão de carregamento 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 fotografados em aparelho L.PIX (*Loccus Biotecnologia*).

3.8 Caracterização proteica

3.8.1 Extração de proteínas

As proteínas foram extraída segundo o protocolo de Lecadet et al. (1991), no qual o isolado foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura AN sólido a 28 °C durante 24 h, posteriormente, uma colônia foi transferida para Erlenmeyer contendo 12 mL de caldo nutriente mantido à 28 °C durante 52 h, em *Shaker* a 200 rpm. Em seguida, 1,5 mL do cultivo foi depositado em tubos de 2 mL e centrifugado a 12000 xg por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado com 1,5 mL de NaCl 0,5 M e agitado em vortex, após centrifugado a 12000 xg por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de PMSF 1 mM (solução para inibição da atividade proteásica) e agitado em vortex e centrifugado a 12000 xg por 15 min a 4 °C, esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 500 µL de PMSF 1 mM e estocado em freezer (-20°C).

A amostra foi preparada retirando-se de uma alíquota de 25 µl contendo o complexo esporo-cristal, adicionados 25 µL de tampão de amostra (62mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β-mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol), fervidas a 100

°C/10 min. Para comparação dos resultados foi preparada uma amostra da estirpe padrão *Bti* T14 001 nas mesmas condições anteriormente descritas.

3.8.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)

As preparações de esporos-cristais do isolado estudado foi analisada de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), que consiste na utilização do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE 12%), em condições desnaturante.

A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida consiste em um gel composto por duas concentrações: um primeiro gel de malha mais fina 5% o concentrador, cuja função é de compactar a amostra e o separador numa concentração de 12% de acrilamida, cuja função é separar o complexo SDS-proteína em função da sua massa molecular. Após a preparação dos géis, da amostra foi retirado 40 µL e aplicada no gel de poliacrilamida SDS-PAGE numa concentração de 12%, e como padrão de massa molecular de proteína foi adicionado 5 µL do marcador *Broad Range Protein Molecular* (Promega de 225 a 10 kDa), como referência para identificação das proteínas.

Os géis foram colocados em cuba de eletroforese vertical, preenchida com tampão de corrida 1x (25 mM Tris-HCl, 35 mM SDS e 1,92 mM Glicina) e submetido a um campo elétrico de 150 V por 1:50 h, após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi corado em solução de *Comassie Blue* corante (50% metanol, 10% de ácido acético 10% e 0,1% de *Comassie Brillhante blue 250-R*) por 1 h em temperatura ambiente e descorado em solução descorante (10% metanol e 10% de ácido acético) até a visualização das bandas de proteínas que correspondem às toxinas presentes no isolado.

O gel foi guardado em papel celofane, em seguida digitalizado e analisado quanto à presença das proteínas de ação inseticida de interesse, conforme descrição da literatura.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e identificação de *Bacillus thuringiensis*

Realizou-se 15 coletas de amostras de solo sendo oito no ecossistema restinga e sete no ecossistema mangue nos municípios de São Luís, São José de Ribamar e Raposa (Tabela 4). Dessas 15 amostras foram isoladas 284 colônias bacterianas. Essas colônias após análise morfológica, coloração de Gram, crescimento em penicilina G e visualização em microscopia de contraste de fase (1000x) para a verificação de inclusões cristalinas, 232 (81,6%) foram identificadas como *B. thuringiensis* (Tabela 4).

Dos 232 isolados de *B. thuringiensis*, 110 (47,4%) foram provenientes do solo de restinga e 122 (52,6%) do solo de mangue (Tabela 4). Em termos quantitativos, o maior número de isolados por amostra foi verificado nas amostras 165 e 170 provenientes dos municípios São Luís e Raposa, respectivamente. O índice de colônias de *B. thuringiensis* em relação ao número de colônias bacterianas examinadas no geral variou de 0 a 1,0, sendo uma média geral de 0,81 (Tabela 4).

Tabela 4. Isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos a partir de amostras de solo dos ecossistemas restinga e mangue em três municípios do estado do Maranhão.

Ecossistema	Amostra de solo ¹	Municípios	CB ²	nBt ³	nBt/nCB ⁴
Restinga	157	São José de Ribamar	33	20	0,60
	158	São José de Ribamar	16	16	1,0
	159	São José de Ribamar	4	0	0
	160	São José de Ribamar	2	1	0,50
	161	São José de Ribamar	2	0	0
	164	São Luís	25	24	0,96
	165	São Luís	30	30	1,0
	166	São Luís	30	19	0,63
	Mangue	162	São José de Ribamar	18	18
163		São José de Ribamar	5	4	0,80
167		São Luís	22	20	0,90
168		Raposa	25	25	1,0
169		Raposa	1	1	1,0
170		Raposa	31	31	1,0
171		Raposa	18	18	1,0
Total			284	232	0,81

¹A numeração das amostras de solo é de acordo com a sequência das coletas realizadas nos Ecossistemas do Maranhão; ²CB – Colônia Bacteriana; ³nBt colônia de *Bacillus thuringiensis*; ⁴nBt/nCB número isolados de *Bacillus thuringiensis* obtidos em relação dividido pelo número total de colônias bacterianas observadas em cada amostra.

4.2 Bioensaios de susceptibilidade

Cem isolados de *B. thuringiensis* dos 232 foram submetidos ao bioensaio de susceptibilidade, sendo 50 isolados da restinga e 50 isolados do mangue. Desses, apenas o isolado BtMA-750, proveniente da amostra 157 da restinga, coletada no município de São José de Ribamar, apresentou patogenicidade às larvas de *A. aegypti*, com 100% de mortalidade em menos de 24 horas, após a aplicação da suspensão esporos/cristais na concentração de 1×10^8 .

4.3 Bioensaios quantitativos

Esse bioensaio foi realizado com o isolado BtMA-750. Os dados de concentração-mortalidade, ajustaram ao de modelo de probit (χ^2 não significativo, $P < 0,05$). A concentração requerida do isolado para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *A. aegypti* foi de 0,0044 mg/mL (Tabela 5). E a concentração requerida do isolado para ocasionar a mortalidade de 90% da população de *A. aegypti* foi de 0,01 mg/mL.

Em comparação às CL_{50} e CL_{90} verificadas para o *Bti* (0,0028 mg/mL e 0,012 mg/mL, respectivamente), observa-se que essa linhagem apresentou valores menores, indicando ser mais tóxica do que o isolado BtMA-750, entretanto o isolado tem potencial para ser emprego no controle biológico de vetores.

Tabela 5. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao isolado BtMA-750, proveniente da restinga, Maranhão.

Isolados	N ¹	Inclinação ± EP ²	CL ₅₀ IC (95%) ³	CL ₉₀ IC (95%) ³	χ^2 (GL) ⁴
<i>Bti</i> T14 001 ⁵	1000	2,03±0,09	0,0028 (0,0021-0,0037)	0,012 (0,0092-0,0180)	6,68(3)
BtMA-750	1000	3,74±0,18	0,0044 (0,003-0,005)	0,01 (0,0081-0,0124)	7,52(3)

¹Número total de insetos testados; ²Inclinação ± Erro Padrão; ³Intervalo de confiança; ⁴ Qui-quadrado e Grau de liberdade; ⁵*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* T14 001.

4.4 Detecção dos genes *cry*, *cyt* e *chi* por PCR

A análise por meio da PCR permitiu verificar que o isolado BtMA-750 amplificou os fragmentos de DNA para os nove genes *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba* (Figura 6) *cry4Aa*, *cry4Ba* (Figura 7) e *chi* com tamanhos banda esperados (Figura 8).

Figura 6. Perfil eletroforético do material genético do isolado de *Bacillus thuringiensis* BtMA-750 da restinga amplificados com a utilização dos iniciadores: *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba* e *cry10Aa*. CP: controle positivo; CN: controle negativo; MM: marcador molecular (1 Kb DNA Ladder)

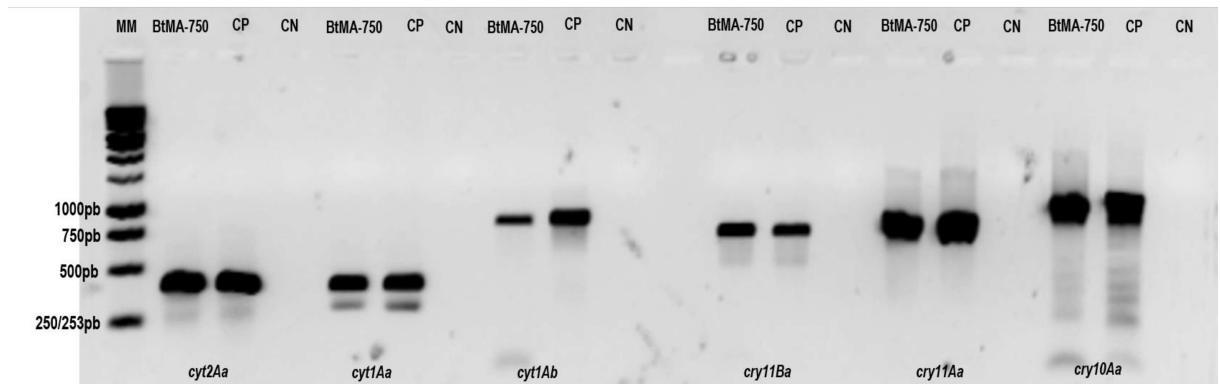


Figura 7. Perfil eletroforético do material genético do isolado de *Bacillus thuringiensis* BtMA-750 da restinga amplificados com a utilização dos iniciadores: *cry4Aa*, *cry4Ba*. CP: controle positivo; CN: controle negativo; MM: marcador molecular (1 Kb DNA Ladder)

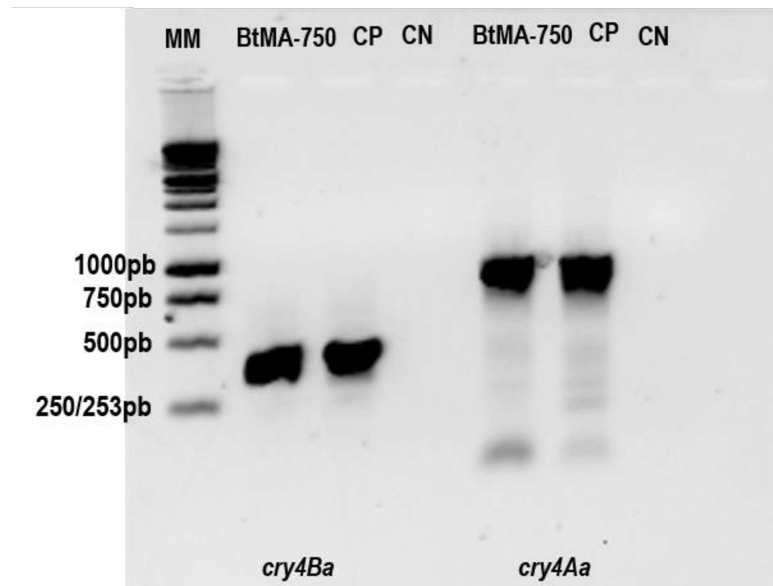
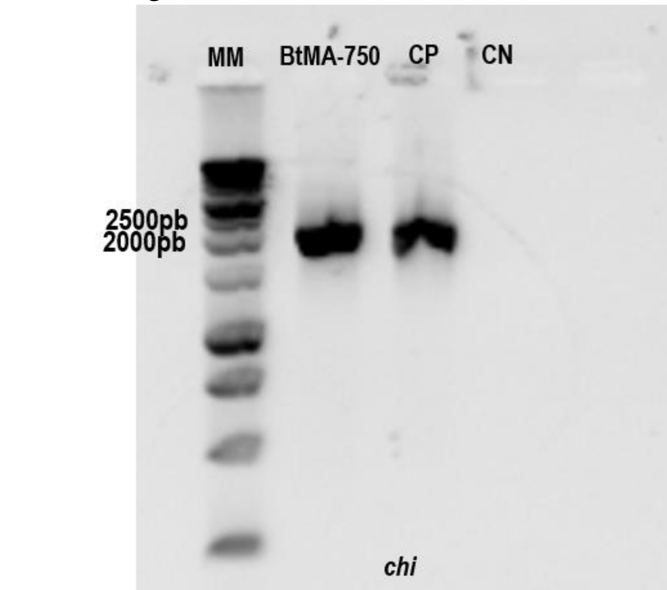


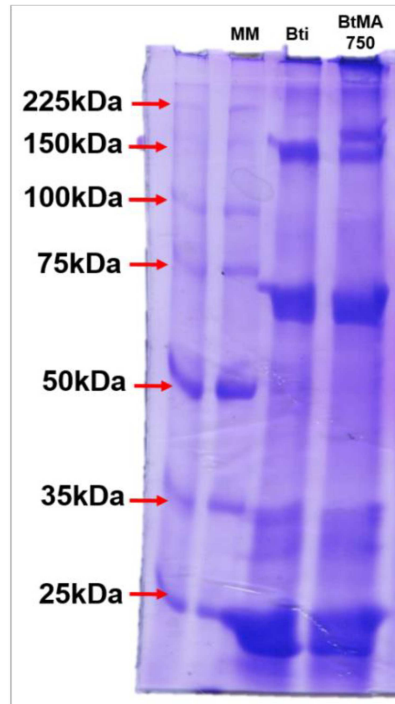
Figura 8. Perfil eletroforético do material genético do isolado de *Bacillus thuringiensis* BtMA-750 da restinga amplificados com a utilização do iniciador: *chi*. CP: controle positivo; CN: controle negativo; MM: marcador molecular (1 Kb DNA Ladder)



4.5 Perfil proteico do BtMA-750

O isolado BtMA-750 apresentou proteínas de massa molecular de tamanho 140kDa e 72kDa, sendo compatível com o tamanho das Cry4 e Cry11, respectivamente. Em relação a classe Cyt, o isolado apresentou proteínas de massa molecular menor que 50kDa semelhante ao das toxinas Cyt1 e Cyt2 (Figura 9). E a partir deste resultado pode se verificar que o isolado BtMA-750 apresentou perfil proteico semelhante ao da estirpe de referência (Figura 9), sendo a única diferença, uma banda superior a 150kDa expressa pelo BtMA-750.

Figura 9. Padrão de massas moleculares obtido a partir de SDS-PAGE 12% para análise das proteínas do isolado BtMA-750. MM.: marcador molecular; *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) T14 001



5 DISCUSSÃO

O solo é o substrato mais utilizado para o isolamento de *B. thuringiensis* (IBARRA et al., 2003; COSTA et al., 2010; AMMOUNEH et al., 2011; BAKRI et al., 2012; FAKRUDDIN et al., 2012; SOARES-DA-SILVA et al., 2015; DAGGA et al., 2016), sendo essa bactéria amplamente encontrada na natureza predominantemente na forma de esporos, que podem se disseminar amplamente pelo ambiente, uma vez que esses esporos podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo (de MAAGD et al., 2003).

O solo dos ecossistemas mangue e restinga demonstrou alto potencial em conter isolados de *B. thuringiensis*, com índice de colônias de *B. thuringiensis* de 0,85 (mangue) e 0,77 (restinga). Resultados diferentes foram verificados por Baig e Mehnaz (2010) em sedimentos marinhos do Mar Arábico ao longo da área costeira do Paquistão que ao analisarem 200 colônias de bactérias identificaram índice de colônias de *B. thuringiensis* de 0,15 e Maeda et al. (2001) que obtiveram índice de colônias de *B. thuringiensis* de 0,01, ao examinar 1378 colônias de *B. cereus/B. thuringiensis*.

A variação do índice de *Bt* observada nos diversos trabalhos pode estar associada a diferentes fatores, como as propriedades químicas do solo e as condições climáticas (POLANCZYK et al., 2004). Para Soares-da-Silva et al. (2015) a escolha do substrato, método de coleta em campo e processo de identificação influenciam na eficiência do isolamento de *B. thuringiensis*.

A baixa porcentagem de isolados de *B. thuringiensis* com ação inseticida a larvas de *A. aegypti* é bastante relatada (DIAS et al., 2002; PRAÇA et al., 2004; CAVALEIRO et al., 2005; OOTANI et al., 2011). A frequência de isolados de *B. thuringiensis* com atividade inseticida é relativamente baixa para ordem Diptera quando comparada com outras ordens de inseto (DIAS et al., 2002; SILVA et al., 2002; CAVALEIRO et al., 2005; COSTA et al., 2010), sendo verificado que uma maior frequência de isolados de *B. thuringiensis* com atividade tóxica ocorre em insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera (SILVA-WERNECK et al., 2000; POLANCZYK et al., 2004; AMMOUNEH et al., 2011; SILVA et al., 2012).

O isolado BtMA-750 mostrou alto potencial para o controle de larvas de *A. aegypti* podendo ser utilizado em programas de controle desse vetor. A elevada toxicidade desse isolado pode estar relacionada com a presença dos genes *cry* e *cyt* (*cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*), corroborando com o conteúdo proteico que sugeriu a presença das proteínas Cry4, Cry11 e Cyt, que são codificadas por esses genes.

As proteínas Cry4A e Cry4B têm sido bastante relatadas apresentando atividade tóxica contra insetos da ordem Diptera. A toxina Cry4Ba é altamente tóxica a larvas de *Aedes*, já a Cry4Aa é menos tóxicas (ANGSUTHANASOMBAT; CRICKMORE; ELLAR, 1992; PONCET et al., 1995; ABDULLAH et al., 2003; BELTRÃO; SILVA-FILHA 2007; OTIENO-AYAYO et al., 2008). Essas proteínas também têm sido reportadas agindo sinergicamente em larvas de mosquito (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Com relação à toxina Cry10Aa, Hernández-Soto et al., (2009), detectaram elevada toxicidade contra larvas de *A. aegypti*, em bioensaios, quando em sinergismo com a toxina Cyt1Aa.

A importância da proteína Cry11Aa na toxicidade contra larvas de mosquito é também conhecida (YAMAGIWA et al., 2002; FERNÁNDEZ et al., 2005). Em alguns estudos a toxina Cry11Aa apresentou alta toxicidade contra as larvas de *Aedes* e *Culex*, mas baixa contra *Anopheles* (REVINA et al., 2004; FERNÁNDEZ et al., 2006; OTIENO-AYAYO et al., 2008). Costa et al. (2010) encontraram o gene *cry11Aa* em todos os isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram eficiência na mortalidade de larvas de *A. aegypti* em todos os períodos avaliados.

A atividade larvicida da toxina Cyt1Aa é baixa contra as larvas de *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (BOURGOUIN et al., 1986; THIERY et al., 1997; OTIENO-AYAYO et al., 2008). No entanto, sinergiza o efeito tóxico das proteínas Cry (DELECLUSE et al., 1988; PÉREZ et al., 2005; HERNÁNDEZ-SOTO et al., 2009). A toxina Cyt1Aa tem a propriedade de se inserir diretamente na membrana celular, sem ser mediada por receptores específicos, e pode agir como uma molécula receptora da toxina Cry11Aa. Evidências demonstraram que o bom sinergismo entre Cry11Aa e Cyt1Aa e alta toxicidade a larvas de *A. aegypti* foi positivamente correlacionado, assim como a alta afinidade no perfil de ligação dessas toxinas aos receptores (PÉREZ et al., 2005).

Um fato interessante é que a toxina Cyt1Aa desempenha uma função crucial que impede as proteínas Cry do *Bti* de perder a sua atividade tóxica, ou seja, retarda a evolução da resistência das proteínas Cry em mosquito (CRICKMORE et al. 1995; GEORGHIOU; WIRTH, 1997; WIRTH; GEORGHIOU, 1997; WIRTH et al. 2005).

A proteína Cyt2Aa também apresenta alta atividade sinérgica com as proteínas Cry (WIRTH et al., 2001; PROMDONKOY et al., 2005; NISNEVITCH et al., 2006; LAILAK et al., 2013). PROMDONKOY et al. (2005) verificaram que a coexpressão das toxinas Cry4Ba e Cyt2Aa, produzidas em *E. coli* incrementou a toxicidade para larvas de *A.*

aegypti e *C. quinquefasciatus*, demonstrando, com isto, a alta atividade sinérgica entre as toxinas combinadas.

Apesar do isolado BtMA-750 apresentar genes díptero-específicos semelhante aos encontrados no *Bti*, que é o patógeno mais eficiente utilizado em formulações para o controle desse mosquito (BRAVO et al., 2011; BEN-DOV, 2014), não é possível afirmar quais dos genes estão envolvidos na toxicidade do isolado ou se está ocorrendo sinergismo entre eles. Nesse caso, o estudos das proteínas isoladas forneceria informações sobre quais toxinas estão provocando a toxicidade do isolado.

A presença do gene *chi* no isolado BtMA-750 pode estar contribuindo para a toxicidade desse isolado, uma vez que esse gene codifica a enzima quitinase que é outro mecanismo de ação inseticida do *B. thuringiensis* (DUMAS et al., 2009), e pode está agindo em sinergismo com as δ -endotoxinas aumentando a sua toxicidade (LIU et al., 2002).

Evidencia-se que o isolado BtMA-750 mostra-se promissor para ser usado no controle biológico de vetores, pois o isolado apresentou todos os genes díptero-específicos, responsáveis por codificar as toxinas inseticidas.

6 CONCLUSÃO

O solo dos ecossistemas restinga e mangue do estado do Maranhão mostraram-se propícios para a prospecção de isolados de *B. thuringiensis*, no entanto apenas um isolado de BtMA apresentou elevada toxicidade as larvas de *A. aegypti* e suas CL₅₀ e CL₉₀ adequadas para provocar mortalidade em 50% e 90% da população de mosquitos vetores. Esta toxicidade estaria relacionada ao seu conteúdo gênico e proteico, devido a presença dos genes que codificam as toxinas Cry, Cyt e quitinase responsáveis pela toxicidade do *B. thuringiensis*.

Os dados obtidos nesse estudo demonstraram a variabilidade de genes inseticidas que um único isolado pode conter, estes genes podem ser utilizados em combinação para evitar o desenvolvimento de resistência de populações do *A. aegypti*, como já foi constatada pelo uso demasiado de inseticidas químicos.

Portanto, é de extrema relevância a busca contínua por novos isolados na tentativa de controlar as doenças transmitidas pelo *A. aegypti*. A produção de formulações de bioinseticidas a partir de linhagens que estejam adaptadas às condições da nossa região, proporcionaria um produto altamente eficiente e de baixo custo, além disso, é uma alternativa viável para reduzir o uso de inseticidas químicos que são nocivos ao homem e ao ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M. A.; ALZATE, O.; MOHAMMAD, M.; J. MCNAL, R.; ADAN, M. J.; DEAN, D. H. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4ba by protein engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5343-5353, Sept. 2003.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produces so much insecticidal crystal protein? **Journal Bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, Nov. 1995.
- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Viena, Va, v. 18, p. 265-267, Apr. 1925.
- ALMEIDA, J. E. M.; FILHO, A. B. Banco de Microrganismos Entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20 – maio/junho 2001.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ/USP, São Paulo. 1998, 1163p.
- ALVES, L. F. A.; FILHO, A. B. Formulação de entomopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 5, mar./abr. 1998.
- ALVES, S. B.; MORAES S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ/USP, 1998. p. 765-777.
- AMMOUNEH, H.; HARBA, M.; IDRIS, E.; MAKEE, H. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. **Tübitak**, v. 35, p. 421-431, 2011.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 945-958, out./dez. 2010.
- ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, n. 73, p. 63-68, July 1992.
- ARAÚJO, A. P.; SANTOS, M. A.V. M.; CARLOS, S. O. RIOS, E. M. M. M. REGIS. L. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 339-347. Mar. 2007.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 1-8, Febr. 2001.
- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G. M. C.; SILVA, I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 17-25, jan./fev. 2003.

ASOKAN, R.; PUTTASWAMY. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner from Soil, leaf, seed dust and insect cadaver. *Journal of biological control*, v. 21, n. 1, June 2007.

BAIG, D.; N.; MEHNAZ. S. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. **Microbiological Research**, v. 165, n. 5, p. 376-383. July 2010.

BAKRI, Y.; AMMOUNEH, H.; EL-KHOURI, S.; HARBA, M.; THONART, P. Isolation and identification of a new *Bacillus* strain for amylase production. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 51-58, 2012.

BANDEIRA, I. C. N. **Geodiversidade do estado do Maranhão**. Programa geologia do Brasil levantamento da geodiversidade Teresina, CPRM, 2013. 294p.

BELTRÃO, H. B. M.; SILVA FILHA, M. H. N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 2, p. 163-169, Jan. 2007.

BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, n. 1, p. 59-68, July 1997.

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its dipteran-specific toxins. **Toxins**, v. 6, p. 1222-1243, Mar. 2014.

BESERRA, E. B.; FREITAS, E. M.; SOUZA, J. T.; FERNANDES, C. R. M.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 99, n. 3, p. 281-285, set. 2009.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO, JR. F. P. de. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 303-307, Mar./Apr. 2007.

BLANC, M.; KAELIN, P.; GADANI, F. *Bacillus thuringiensis* (Bt) for the control of insect pests in stored tobacco: a review. **Beiträge zur Tabakforschung International**, v. 20, n. 1, p. 15-22, Febr. 2002.

BRASIL/SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília-DF, v.47, n. 27, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/30/2016-021.pdf>> Acesso em: 15 de jun. 2016.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, Mar. 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 6, n. 4, p. 279-293, out./dez. 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVON, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, July 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBÉRON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, México, v. 49, n. 4, p. 423-435. Mar. 2007.

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

BOURGOUIN, C.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and mosquitocidal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 205, p. 390-397.1986.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 232-236, 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 87**, Brasília, 2005.

CADAVID-RESTREPO, G.; SAHAZA, J.; ORDUZ, S. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 1, p. 74-79, Febr. 2012.

CHIARAVALLOTI-NETO, F. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 279-285. 1997.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; BRAVO, A.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; VAN RIE, J.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 12 jul. 2016.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, n. 3, p. 249-254. Sept. 1995.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. 228p.

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

DAGGA, A.; AZIZ, M. A.; AL AMNAMA, A. AL'RAOOF.; AL-SHARIF, M.; EL HINDI, M. Isolation and molecular characterization of Cry gene for *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Gaza Strip. **International Journal Current Microbiology and Appiled Sciences**, v. 5, n. 4, p. 659-666, 2016.

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, 2003.

DIAS, D. G. S.; SILVA, S. F. MARTINS, SOARES, E. S. C. M. S. FALCÃO, R. GOMES, A. C. M. M. PRAÇA, L. B. DIAS, J. M. C. S. MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 30, Brasília-DF, dez. 2002.

DELECLUSE, A.; BOURGOUIN, C.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins encoded by two different genes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 214, n. 1, p. 42-47, 1998.

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 Health Organization/Bank/WHO Special Programme for Research and training in tropical diseases (TDR), 1990. 58p.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 18, n. 1, p. 283-285, jan./mar. 2015.

DUMAS, V. F.; GOLDENBERG, C. S.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; QUEIROZ, P. R.; MONNERAT, R. G.; MELO, F. R. Chitinase and cellulase activity from *Bacillus thuringiensis* strains. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2009.

FAKRUDDIN, M.; AHMED, M. M.; SARKER, N.; NOOR, R. Protein profiling of *Bacillus thuringiensis* isolated from agro-forest soil in Bangladesh. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 139-145, Oct. 2012.

FERNANDEZ, L.E.; PEREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRIGUEZ, M.H.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II. **FEBS Letters**, v. 579, n. 17, p. 3508-3514. July 2005.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. London, Cambridge University, 1971. 333p.

FINKLER, C. L. L. Controle de insetos: uma revisão. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 8, n. 9, p. 169-189, 2011/2012.

FIUZA, L. M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biocologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, 2009/2011.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. v. 2, São Paulo-SP: EDUSP, 2002. 864p.

GEETHA, I.; PRABAKARAN, G.; PAILY, K. P.; MANONMANI, A. M.; BALARAMAN, K. Characterisation of three mosquitocidal *Bacillus* strains isolated from mangrove forest. **Biological Control**. v. 42. n. 1, p. 34-40, July 2007.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M. C. Influence of exposure to single *versus* multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.3, p. 1095-1101, Mar. 1997.

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

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

GUBLER, D.J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–57, Apr./June. 1995.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**, 2. ed. Piracicaba: FEALQ/USP, 1998. p.383-446.

HANSEN, B. M.; DAMGAARD, P. H.; EILENBERG, J.; PEDERSEN, J. C. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **J. Invertebr. Pathol.** v.71, p. 106-114, Mar. 1998.

HERNÁNDEZ-SOTO, A.; DEL RINCÓN-CASTRO, M.C.; ESPINOZA, A.M.; IBARRA, J.E. Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4661-4667, July 2009.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 906-908, mai. 2015.

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

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

IRIARTE, J.; PORCAR M.; LECADET, M.; CABALLERO, P. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. **Current Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 402-408, Jun. 2000.

KONECKA, E.; BARANEK, J.; HRYCAK, A.; KAZNOWSKI, A. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAILAK, C.; KHAOKHIEW, T.; PROMPTAS, C.; PROMDONKOY, B.; POOTANAKIT, K.; ANGSUTHANASOMBAT, C. *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin employs two receptor-binding loops for synergistic interactions with Cyt2Aa2. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 435, n. 2, p. 216–221, May 2013.

LAZCANO, J. A. B.; RODRÍGUEZ, M. M.; SAN MARTÍN, J. L.; ROMERO, J. E.; MONTOYA, R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. **Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal Public Health**, v. 26, n. 3, 2009.

LECADET, M. M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J. E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, Mar. 1991.

LIMA, W. P.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; MACORIS, M. L. G.; ZUCCARI, D. A. P. C.; DIBO, M. R. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 638-641, nov./dez. 2009.

LIMA, E. P.; FILHO, A. M. O.; LIMA, J. W. O.; JUNIOR, A. N. R.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará state. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259-263, mai./jun. 2006.

LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M.V. F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and delta-endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 225-229, May. 2002.

LIN, Y.; XIONG, G. Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 8, p. 635-639, Apr. 2004.

LIU, M.; CAI, Q. X.; LIU, H. Z.; ZHANG, B. H.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 374-379, Apr. 2002.

MAEDA, M.; MIZUKI, E.; HARA, M.; TANAKA, R.; AKAO, T.; YAMASHITA, S.; OHBA, M. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from intertidal brackish sediments in mangroves. **Microbiological Research**, v. 156, n. 2, p. 195-198, 2001.

MAIA, A.; DIREITO, I. C. N., FIGUEIRÓ, R. Controle biológico de simuliídeos (Diptera: Simuliidae): panorama e perspectivas. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, n. 25, quadrimestral, p. 89-104, ago. 2014.

MANASHEROB, R.; ITSKO, M.; SELA-BARANES, N.; BEN-DOV, E.; BERRY, C.; COHEN, S.; ZARITSKY, A. Cyt1Ca from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: production in *Escherichia coli* and comparison of its biological activities with those of other Cyt-like proteins. **Microbiology**, v. 152, p. 2651-2659. Sept. 2006.

MARCON, J.; TAKETANI, R. G.; DINI-ANDREOTE, F.; MAZZERO, G. I.; SOARES JUNIOR, F. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ANDREOT, F. D. Draft Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain BrMgv02- JM63, a chitinolytic bacterium isolated from oil-contaminated mangrove soil in Brazil. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, p.1-2, Jan./Feb. 2014.

MARCOMBE S.; MATHIEU, R. B.; POCQUET, N.; RIAZ, MUHAMMAD-ASAM.; POUPARDIN, R.; SÉLIOR, S.; DARRIE, F.; REYNAUD, S.; YÉBAKIMA, A.; CORBEL, V.; DAVID, JEAN-PHILIPPE.; CHANDRE, F. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. **PLoS One**, v. 7, n. 2, Febr. 2012.

MARCORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, out. 1999.

MARQUES, G. R. A.M.; CHAVES, L. S. M.; SERPA, L. L. N.; ARDUÍNO, M. B.; CHAVES, F. J. M. Public drinking water supply and egg laying by *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 1-8, 2013.

MARTINS, A. J.; LINS, R. M. M. A.; LINSS, J. G. B.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **ASMTH Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 108-115, July 2009.

MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRETT, P.; BURGESS, H. D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1344-1350. Apr. 1992.

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, É. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1145-1148. nov. 2005.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do Banco de Germoplasma de Bactérias Entomopatogênicas do gênero *Bacillus*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, **Documentos nº 60**, Brasília-DF, 2001. 65p.

MONTEIRO, F. J. C. **Monitoramento da dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e da dengue no município de Macapá, Amapá, Brasil**, 2014. 78 f. Dissertação (Pós-graduação em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP, 2014.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205-207, jul./dez. 2002.

NI, H.; ZENG, S.; QIN, X.; SUN, X.; ZHANG, S.; ZHAO, X.; YU, Z.; LI, L. Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* Chitinase to improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematocidal activities. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 3, p. 304-315, Jan. 2015.

NISNEVITCH, M.; COHEN, S.; BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; SOFER, Y.; CAHAN, R. Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Activation by putative endogenous protease **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 1, p. 99 - 105, May 2006.

OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; AZEVEDO, E. B.; GARCIS, B. O.; SANTOS, S. F.; AGUIAR, R. W. S. Avaliação da toxicidade de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para *Aedes aegypti* Linnaeus, (Díptera: Culicidae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 37-43, May 2011.

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

PAHO. Pan American Health Organization. **Dengue and dengue haemorrhagic fever. 2015**. Disponível em: < http://http://www.paho.org/sur/index.php?option=com_content&view=article&id=166%3Adengue-and-dengue-haemorrhagic-fever&catid=734%3Asur.communicable-diseases&Itemid=371> Acesso em julho 2015.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L. E.; SUN, JIANGUANG.; 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. **PNAS**, v. 102, n. 51, Dec. 2005.

PIALOUX, G.; GAUZERE, B. A.; JAUREGUIBERRY, S.; STROBE, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319-327. May. 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.

PINTO, L. M. N.; BERTIZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 38, 2010.

- PINTO, L. M. N.; BERTIZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 2003.
- 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, abr./jun. 2004.
- PONCET, S.; DELECLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic componentes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 66, n. 2, p. 131-135, Sept. 1995.
- PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 5, p. 419-432, Jan. 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. Brasília, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, jan. 2004.
- PROMDONKOY, B.; PROMDONKOY, P.; PANYIM, S. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, 121–126, 2005.
- RAMPERSAD, J.; KHAN, A.; AMMONS, D. Use fullness of Staining Parasporal Bodies when Screening for *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, n. 3, p. 203-204, Mar. 2002.
- RAMPERSAD, J.; AMMONS, D. A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 52, p. 1-11, Sept. 2005.
- REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SENEH, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3581-3586, 1996.
- REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA-FILHA, M. H.; SILVA, S. B.; MACIEL, A.; FURTADO, A. F. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 488-492. Sep./Oct. 2000.
- REVINA, L.P.; KOSTINA, L.I.; GANUSHKINA, L.A.; MIKHAILOVA, A.L.; ZALUNIN, I.A.; CHESTUKHINA, G.G. Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to its N- and C moieties restores its original biological activity. **Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 181–187, Febr. 2004.

SANCHIS, V.; BOURGUET, D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 28, p. 11-20, Nov. 2008.

SANTOS, F. P.; LOPES, J.; VILAS-BÔAS, G. T.; ZEQUI, J. A. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 122, n.1, p. 64-70, Apr. 2012.

SHISHIR, A.; ROY, A.; ISLAM, N.; RAHMAN, A.; KHAN, S. N.; MOZAMMEL HOQ, M. Abundance and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Banglades hand their cry genes profile. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1-10, June 2014.

SILVA, M. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; MARQUES, E. J.; SILVA, L. M.; BARROS, R.; LIMA F.; JOSÃO, V. M.; SILVA, S. M. F. A. *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n.5, p. 583-599, Mar. 2012.

SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Isolamento, Identificação e Caracterização Entomopatogênica de Bacilos de diferentes regiões do Brasil. **Embrapa - Comunicado técnico**, Brasília-DF: 2002.

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

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. Controle biológico e insetos-praga na soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; ROSCOE, R. (Ed.). **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Maracaju, MS: Fundação MS, 2014, p. 178-193.

SMITH, R.A.; G. A. COUCHE. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 311-315. Jan. 1991.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINHEIRO, V. C. S.; LITAIFF-ELEILZA, A.; POLANCZYK, R. A.; T.ADEI, W. P. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* a partir do estado do Amazonas, no Brasil e no rastreio contra *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 1-6, mar. 2015.

SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. **Biotechnologia**, v. 14, p. 303-313, nov. 2007.

SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink sugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**, v. 2014, p. 1-12, Jan. 2014.

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

TETREAU, G.; STALINSKI, R.; DAVID, JEAN-PHILIPPE.; DESPRÉS, L. Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays

with each Cry toxin separately. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n.7, p. 894-900, Nov. 2013.

THIERY, I.; DELECLUSE, A.; TAMAYO, M.C.; ORDUZ, S. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 468-473, Febr. 1997.

TILAK, R.; GUPTA, M. V.; SURYAM, M. V.; YADAV, J. D.; GUPTA, B. K. K. D. A laboratory investigation into oviposition responses of *Aedes aegypti* to some common household substances and water from conspecific larva. **Medical Journal Armed Forces India**. v. 61, n. 3, p. 227-229. July 2005.

VALICENTE, F. H.; M. R. BARRETO. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 639-644. Oct./Dec. 2003.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; NYSTROM, C. The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. 2016. Disponível em: <<http://www.glfccfs.nrcan.gc.ca/bacillus>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?, **Revista Pan-Amazônica Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, abr./jun. 2015.

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

WIRTH, M. C.; PARK, H. W.; WALTON, W. E.; FEDERICI, B. A. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 185-189, Jan. 2005.

WIRTH, M.C.; DELÉCLUSE, A.; WALTON, W.E. Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3280-3284, July 2001.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P. Cross-resistance among CryIV toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 1471-1477, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides world health organization communicable disease control, prevention and eradication who pesticide**. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. 2005

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

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Resistencia de los vectores a los plaguicidas. Versión en español del documento de la Organización Mundial de la Salud No. WHO/VBC/76.609, Ginebra. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)**, v. 86, n. 5, May. 1979.

WHO. World Health organization. **Dengue and severe dengue**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/>>. Acesso em: 9 jun. 2015

YAMAGIWA, M.; OGAWA, R.; YASUDA, K.; NATSUYAMA, H.; SEN, K.; SAKAI, H. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 516-522, Mar. 2002.

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

ZARA A. L. S. A.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, abr./jun. 2016.

ZETTEL, C.; KAUFMAN, P. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). Entomology and Nematology Department, **UF/IFAS Extension**, Gainesville, p. 1-8, 2013.

ZHONG, WAN-FANG.; FGAN, JI-CHAO.; P CAI, ING-ZHONG.; YAN, WEN-ZHAO.; WU, J.; GUO, HUI-FANG. Cloning of the *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto* chitinase (*Schi*) gene and characterization of its protein. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 821-826, Oct./Dec. 2005.