

Boletim de Pesquisa 220 e Desenvolvimento

ISSN 1676 - 340

Setembro, 2008

**Bt-horus, um biolarvicida à base da
Bacillus thuringiensis para controle de
larvas de *Aedes aegypti***



Embrapa

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento

Bt-horus, um biolarvicida à base da Bacillus thuringiensis para controle de larvas de Aedes aegypti

Monnerat, R.G.

Soares, C.M.

Roberg, R.A.

Dumas, V.F.

Ramos, F.R.

Praça, L. B.

Martins, E. S.

Queiroz, P.R.

Sujii, E.R.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600 Fax: (61) 3340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Sergio Folle
Secretário-Executivo: Maria da Graça S. P. Negrão
Membros: : *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: Rosameres Rocha Galvão
Editoração eletrônica: Daniele Alves

1ª edição
1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

B 916 Bt-horus, um biolarvicida à base da *Bacillus thuringiensis* para controle de larvas de *Aedes aegypti*. / R. G. Monnerat ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 220).

1. Dengue. 2. *Bacillus thuringiensis* – controle biológico. I. Monnerat, R. G.
II. Série.

632.96 – CDD 21

Bt-horus, UM BIOLARVICIDA À BASE DA *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Monnerat, R.G.¹

Soares, C.M.²

Roberg, R.A.²

Dumas, V.F.²

Ramos, F.R.¹

Praça, L. B.¹

Martins, E. S.¹

Queiroz, P.R.¹

Sujii, E.R.¹

Resumo

A dengue é uma arbovirose transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, para o qual não existem vacinas. Desta forma, uma alternativa para evitar a doença é por meio do controle do vetor. Uma forma segura e eficaz de combater as larvas do *A. aegypti* é a utilização de bioinseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis*. O Brasil, entretanto, não contava com empresas nacionais capazes de produzir e comercializar produtos dessa natureza, assim, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em parceria com a Bthek Biotecnologia Ltda. empresa genuinamente nacional, desenvolveram o produto Bt-horus SC, que poderá ser utilizado como ferramenta para auxiliar as campanhas de controle da dengue. Este produto foi desenvolvido com tecnologia brasileira, sob a forma de uma suspensão concentrada, está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e apresentou eficácia semelhante aos biolarvicidas importados à base desta mesma bactéria, atualmente utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue do Ministério da Saúde.

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bthek Biotecnologia Ltda.

Abstract

Dengue is an arbovirolosis, transmitted by *Aedes aegypti*, for what there is no vaccines. So, one of the options to control this sickness is controlling the vector. One option safe and efficient to control this insect is the use of bioinsecticides based on the bacteria *Bacillus thuringiensis*. In Brazil, therefore, there where no national companies able to produce and commercialize these kind of products, so, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology in cooperation with Bthek Biotechnology, a national Brazilian company, developed a product called Bt-horus SC, that could be used as a new tool to help the projects to control dengue. This product was developed with 100% of Brazilian technology, as a concentrated suspension, is registered in the Ministry of Health and showed the same level of efficacy compared with imported bioinsecticides based on the same bacteria that are been used in the Brazilian Program to control dengue of Ministry of Healthy.

INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é um inseto da ordem Diptera e o principal vetor da Dengue. Esta doença é uma arbovirose que ocasiona febre e dores no corpo e pode levar a morte. Além de representar uma ameaça na transmissão de doenças, a presença de grandes populações de mosquitos causa incômodos, prejuízos ao turismo e limitações ao trabalho e ao lazer. Em razão dos problemas e ameaças que representam para a sociedade, as populações de mosquitos devem ser monitoradas, e com frequência é necessária a utilização de medidas de controle dessas populações nos ambientes urbano e rural.

Não existem vacinas para imunizar as pessoas, assim, a forma mais viável de evitar a dengue é por meio do combate ao mosquito. O Programa Nacional de Controle da Dengue do Ministério da Saúde preconiza a utilização de larvicidas para controle da doença. No início do programa o larvicida empregado era o Temefós, entretanto o uso contínuo deste produto selecionou populações de mosquitos resistentes (MARCORIS et al., 1999), obrigando o programa a buscar novas alternativas. Assim, desde o ano de 2002, o Ministério da Saúde iniciou a utilização de biolarvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) em todos os locais onde foram detectadas populações de *A. aegypti* resistentes ao Temefós (VILARINHOS, 2002). As vantagens da utilização dessa bactéria são a especificidade, o efeito não poluente, a inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY e SCHNEPF, 1986). Sua utilização é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WORLD..., 1985).

Produtos à base deste bacilo são comercializados em todo o mundo há mais de cinquenta anos, entretanto no Brasil não existiam empresas produzindo nenhum bioinseticida à base dessa bactéria em escala industrial, o que deixou o Brasil totalmente dependente da importação.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui uma coleção de *B. thuringiensis* de onde foram selecionadas estirpes altamente tóxicas a insetos das ordens Coleoptera (MARTINS et al., 2007), Lepidoptera (MONNERAT et al., 2007) e Diptera (MONNERAT et al., 2004, 2005). Em 2000 esta empresa iniciou um projeto de desenvolvimento de um biolarvicida para controle de larvas do *A. aegypti* em parceria com a Bthek Biotecnologia Ltda. Como resultado, surgiu o produto Bt-horus SC que poderá ser utilizado como ferramenta para auxiliar as campanhas de controle da dengue. Este produto foi desenvolvido com tecnologia brasileira, sob a forma de uma suspensão concentrada. Este trabalho teve como objetivo mostrar as fases de desenvolvimento do produto e sua eficácia no controle de larvas de *A. aegypti*.

Material e Métodos

1- Seleção e caracterização da estirpe

Foram utilizadas 1.800 estirpes de *B. thuringiensis* originárias de amostras de solo e água coletadas em diferentes regiões do país, que pertencem ao Banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (MONNERAT et al., 2001). Essas estirpes foram selecionadas pela sua toxicidade a larvas de *A. aegypti* e as mais tóxicas caracterizadas através de morfologia, perfil protéico e composição gênica.

1.1. Toxicidade a larvas de *Aedes aegypti*

Foram realizados dois tipos de bioensaios: o seletivo, ou discriminante, cujo objetivo foi determinar quais estirpes apresentavam atividade entomopatogênica; e o de dose, cujo objetivo foi determinar quais as estirpes mais tóxicas. Para isso foi calculada a concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL₅₀), ou seja, a virulência das estirpes.

Bioensaios seletivos: Realizaram-se bioensaios seletivos com 1.800 estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de 2^o estágio de *A. aegypti*. Essas larvas foram obtidas na criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (SCHMIT et al., 2001) Para a realização do bioensaio seletivo, 1 ml do caldo bacteriano crescido em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) por 48 horas a 28°C e 200 rpm, foi colocado em 2 copos descartáveis de 200 ml contendo 100 ml de água destilada e 25 larvas de 2^o estágio de *A. aegypti*. Um copo sem a cultura foi deixado como controle. O bioensaio foi colocado em uma sala sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo utilizados na criação de insetos. Após 24 horas realizou-se a leitura do número de larvas mortas. Foram

consideradas patogênicas as estirpes que causaram 90% ou mais de mortalidade às larvas (MONNERAT et al., 2005).

Bioensaio de dose (CL₅₀): As estirpes consideradas patogênicas no bioensaio seletivo foram submetidas ao bioensaio de dose. Para determinação da CL₅₀ a cultura bacteriana foi cultivada nas mesmas condições descritas no ítem anterior e em seguida foram centrifugadas a 12.800 x g por 30 minutos, a 4 °C (BR4i centrífuga Jouan). Os pellets foram congelados por 16 horas e liofilizados por 18 horas em liofilizador Labconco modelo Lymphlock. Em seguida o material foi pesado para ser utilizado nos bioensaios.

O bioensaio foi realizado em triplicata, como para o bioensaio seletivo. Três copos sem a cultura foram deixados como testemunha. Vinte e quatro horas após o início do teste foi feita a contagem do número de larvas mortas, e determinou-se a CL₅₀ (concentração letal necessária para matar 50% das larvas testadas), através da análise de Probits (FINNEY, 1971).

Para comparação dos resultados fez-se o controle positivo com *B. thuringiensis israelensis* (Bti), IPS-82, proveniente da Coleção de Bactérias Entomopatogênicas do Instituto Pasteur de Paris.

As estirpes mais patogênicas foram submetidas a caracterização morfológica, protéica e de composição gênica.

1.2. Caracterização morfológica ultra-estrutural

A caracterização ultra-estrutural foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Os cristais de *B. thuringiensis* foram purificados de acordo com o protocolo descrito por Thomas e Ellar (1983), em seguida foram liofilizadas em liofilizador Labconco modelo Lymphlock, depositadas sobre suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

1.3. Determinação do perfil de proteínas

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio NYSM por 72 horas em incubador rotativo a 28 °C e 200 rpm e, em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet et al. (1991). O complexo esporo-cristal das estirpes foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE a 10%, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), em aparelho Hoefer miniVE vertical eletroforesis system, em voltagem constante de 120 V. O gel foi corado em solução corante de Comassie blue (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por uma hora e descorado com solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético em torno de duas horas até a visualização dos perfis protéicos das estirpes.

1.4 Perfil molecular

As estirpes selecionadas foram caracterizadas de acordo com a presença de genes codificadores de proteínas Cry. Para tal, reações de PCR foram realizadas usando oligonucleotídeos específicos desenhados para amplificar os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cyt1* e *cyt2* (CERON et al., 1995; BRAVO et al., 1998; IBARRA et al., 2003).

A extração do DNA total das estirpes selecionadas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bravo et al. (1998). As reações de PCR foram feitas em termociclador PTC-100TM (MJ Research). Para cada amostra 15 µl do DNA genômico foi transferido para tubos de polipropileno contendo 0,5 mM de cada oligonucleotídeo específico, 0,2 mM de dNTP, tampão da enzima *Taq*DNApol a 1X e 2,5 U de *Taq*DNApol em um volume final de 50 µl. As condições de amplificação foram as mesmas descritas por Ceron et al., 1995, Bravo et al., 1998 e Ibarra et al., 2003, para cada oligonucleotídeo específico. Os produtos da amplificação por PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1,5%. O gel foi corado em solução de EtBr (10 µg/ml), descorado em H₂O e visualizado em foto-documentador modelo Eagle Eye (Stratagene).

2- Desenvolvimento do produto formulado

2.1- Desenvolvimento do meio de cultura e condições fermentativas

A bactéria foi crescida em meio líquido constituído de 40,0 g/L de açúcar refinado, 20,0 g/L de farelo de soja moído, 25,0 g/L de água de maceração de milho, 8,0 g/L de KH₂PO₄, 8,0 g/L de K₂HPO₄, 1,5 g/L de MgSO₄.7H₂O, 0,20 g/L de CaCl₂.2H₂O e 0,09 g/L de MnSO₄.H₂O, em reator de 1000 litros, por 48 horas, a 30 °C e 20% de oxigenação. O pH foi mantido na faixa de 7 a 8 pela adição de ácido (ácido propiônico) ou base (hidróxido de sódio).

Durante as 30 horas de fermentação o processo foi acompanhado a cada 2 horas, pela retirada de amostras, onde se avaliou a morfologia celular e a biomassa.

2.1.1. Morfologia celular: As amostras foram observadas a fresco em microscópio de contraste de fases para a verificação das fases de crescimento bacteriano (vegetativo, formação de esporângios e esporulação).

2.1.2. Biomassa: Alíquotas de 2 mL dos cultivos foram filtradas a vácuo em membranas MILLIPORE, GS 0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro, previamente pesadas. O material foi submetido a duas lavagens com água destilada. A seguir, as membranas Millipore com o resíduo foram colocadas na estufa de secagem a 80 °C por aproximadamente duas horas até a estabilização do peso. A produção de biomassa (o peso seco) foi determinada pela

diferença das massas da membrana com bactéria e da membrana sem bactéria. O peso seco do meio de cultura, livre de bactéria, foi descontado do peso final.

2.2. Recuperação da biomassa

A biomassa produzida foi separada do meio de cultivo através de filtração tangencial Frings-Microdyn por 2 horas. A biomassa foi desta forma concentrada cerca de 5 vezes.

2.3. Formulação

A formulação bacteriana foi preparada adicionando-se à biomassa óleo mineral (30 g/L), Tween 80 (20g/L), Goma Xantana (4g/L) e nipagim (Metilparabeno) 17,6 g/L como conservante. O material foi homogeneizado em batedeira e envasado.

2.4. Determinação da potência

A potência do produto foi determinada segundo o método descrito por Habib et al. (1998). Determinou-se a CL₅₀ do produto e do padrão Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis* IPS-82 produzido pelo Instituto Pasteur, Paris – França, que apresenta 15.000, como valor de UTI (unidades tóxicas internacionais). A UTI do produto foi determinada através da fórmula: $UTI \text{ do padrão} \times CL_{50} \text{ do padrão} \div CL_{50} \text{ do produto teste}$. Esse teste foi feito com 3 diferentes lotes do produto.

3- Testes de campo em condições simuladas

Os testes foram realizados em condições de campo controladas, em caixas d'água de fibra de vidro de 250 litros, protegidas com telados, de modo a permitir a exposição à luz natural, em local sombreado e a temperatura ambiente na faixa de 25°C a 30°C.

O tratamento foi realizado em triplicata e a dose empregada foi de 10 ppm. A eficácia e persistência do produto foi avaliada utilizando a população de *A. aegypti* mantida na criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. No controle não foi adicionado nenhum produto.

A cada dez dias as caixas eram repovoadas com 25 larvas de segundo instar de *A. aegypti*. Três vezes por semana 20% da água era retirada e repostada logo em seguida, simulando a utilização da mesma. Diariamente as caixas foram inspecionadas e as pupas removidas e contadas. A atividade larvicida e persistência da formulação, expressas em porcentagem de mortalidade, foram determinadas pela diferença entre o número inicial de larvas e o número de pupas produzidas (MULLA et al., 2004; VILARINHOS e MONNERAT, 2004). As taxas de mortalidade foram comparadas por análise de variância de dois fatores (avaliação x produto) e o efeito de cada produto por teste t, com auxílio do programa estatístico Sigmastat (KUO et al., 1992).

Resultados e Discussão

1- Seleção e caracterização da estirpe

Das 1.800 estirpes, 11 causaram mortalidade acima de 90% e tiveram as CL₅₀ determinadas (Tabela 1).

Dentre essas 11 estirpes, a S1785 e a S1806 foram as que apresentaram os menores valores de CL₅₀, e, portanto, as mais tóxicas (CL₅₀ de 4,7 µg/ml e 2,09 µg/ml respectivamente), sendo estes valores semelhantes ao da CL₅₀ do padrão Bti (Tabela 1).

As estirpes S1782, S1783, S1789, S1791, S1794, S1795, S1800, S1801 e S1809 apresentaram CL₅₀ que variaram entre 10,45 µg/ml e 14,23 µg/ml, estatisticamente semelhantes entre si, mas estatisticamente diferentes das 2 estirpes mais tóxicas e do padrão (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de CL₅₀ (µg/ml) das estirpes de *Bacillus thuringiensis* contra *Aedes aegypti*

Estirpes	CL ₅₀	Intervalo de confiança	Homologia
S1782	12,3	8,8 - 16,57	B
S1783	11,83	8,33 - 15,98	B
S1785	4,7	3,18 - 6,69	A
S1789	11,36	7,89 - 15,4	B
S1791	10,45	6,92 - 14,28	B
S1794	13,25	9,72 - 17,81	B
S1795	14,23	10,63 - 19,1	B
S1800	10,45	6,92 - 14,28	B
S1801	11,83	8,33 - 15,98	B
S1806	2,09	0,75 - 3,28	A
S1809	11,36	7,86 - 15,4	B
Bti	4,38	2,98 - 6,29	A

Apenas as estirpes mais tóxicas (S1785 e S1806) e o padrão Bti foram analisados morfológicamente, quanto ao perfil protéico e composição de genes *cry*.

A análise morfológica através de microscopia eletrônica de varredura mostrou que as estirpes S1785 e S1806 apresentam cristais semelhantes ao do padrão Bti (Figura 1).

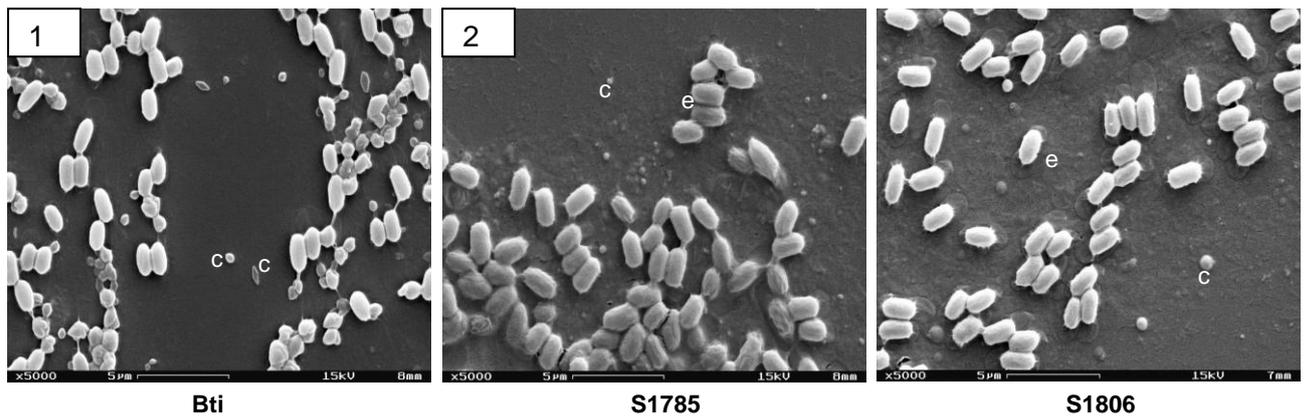


Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais de diferentes estirpes de *Bacillus thuringiensis* (1) Bti, (2) estirpe S1785, (3) estirpe S1806, mostrando (e) esporos, (c) cristais.

Os perfis de proteínas das estirpes S1785 e S1806 foram bastante semelhantes ao perfil do padrão Bti, apresentando uma banda de cerca de 130 KDa., compatível com o das proteínas Cry4A e Cry4B, uma banda de 70 KDa., compatível com o perfil das proteínas Cry10 e Cry11 e uma banda de 30 KDa compatível com a proteína Cyt1 (Figura 2). Essas proteínas são tóxicas a dípteros e estão presentes na estirpe padrão de Bti (BRAVO *et al.*, 1998).

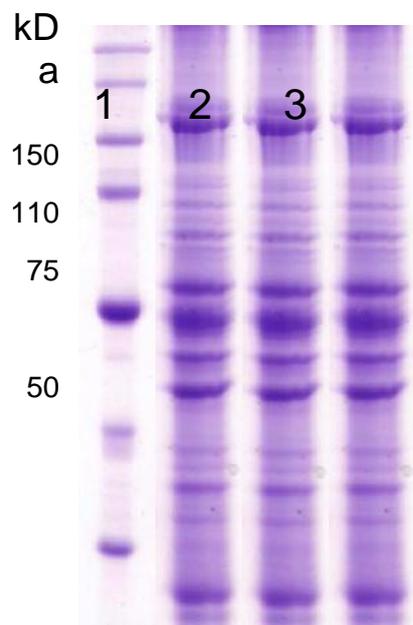


Figura 2: Perfil protéico das proteínas produzidas pelas estirpes tóxicas ao *Aedes aegypti*. 1- Marcador molecular (promega), 2- S1785, 3- S1806, 4- *B. thuringiensis israelensis* (Bti).

A análise do perfil de genes *cry*, efetuada nas estirpes S1785 e S1806, mostrou que ambas apresentam amplicons correspondentes aos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1*, semelhante ao padrão Bti (BRAVO *et al.*, 1998).

O conjunto de dados obtidos na caracterização das estirpes S1785 e S1806, demonstrou que ambas são muito semelhantes ao Bti.

2- Desenvolvimento do produto formulado

O processo fermentativo do Bt-horus foi realizado com a estirpe S1806. A duração da fermentação bacteriana até a completa esporulação foi de 30 horas. Através da análise morfológica pode-se observar que a fase de crescimento exponencial durou 10 horas e a partir daí foi observada a presença de esporângios, indicando o início do processo de esporulação, que terminou com a liberação do complexo esporo-cristal na trigésima hora após o cultivo.

A produção de biomassa foi avaliada durante todo o processo, chegando a 20,8 g/L na vigésima hora após o início da fermentação, quando os esporângios começaram a ser lisados liberando o complexo esporo-cristal (Figura 3). A partir desse momento a biomassa começou a diminuir devido a lise celular e se estabilizou em 14,5 g/L, na trigésima hora de processo, quando todas as células estavam lisadas e o complexo esporo-cristal liberado (Figura 3).

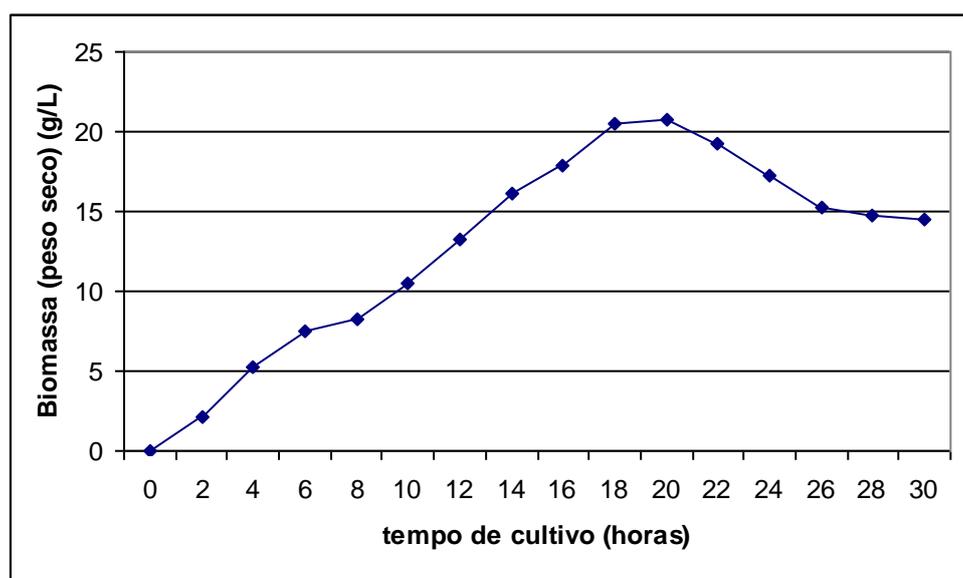


Figura 3: Evolução da produção de biomassa (peso seco) durante o processo fermentativo em função do tempo (horas).

O caldo fermentado foi reduzido a 20% do volume por microfiltração e formulado.

Três lotes do produto foram submetidos a bioensaios para determinação da UTI e observou-se que a variação entre eles foi inferior a 10%, mostrando a homogeneidade e repetibilidade do processo (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado da CL₅₀ e de UTI de três diferentes lotes do produto e do padrão Bti IPS82

Material	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Produto (CL ₅₀)	19,44 µg/mL	23,04 µg/mL	18,86 µg/mL
Padrão (CL ₅₀)	1,54 µg/mL	1,84 µg/mL	1,63 µg/mL
UTI do produto	1.188	1.198	1.296

3- Testes de campo em condições simuladas

Os resultados demonstraram que o produto biológico Bt-horus controlou 100% da população até o vigésimo dia e permaneceu entre 70 e 80% entre os 30 e 70 dias.. A porcentagem de mortalidade média causada pelo produto formulado Bt-horus SC ao longo de 70 dias está apresentada na Figura 4 e apresentou diferença significativa entre as diferentes datas de avaliação (Análise de Variância – Kruskal-Wallis H_{6g.l.} = 17,06, P = 0,009). O teste de comparação de médias (StudentNewman-Keuls, P < 0,05) revela que a mortalidade aos 60 dias foi menor que aos 10 e 20 dias mas não diferiu significativamente das outras avaliações (Tabela 3). A porcentagem média de mortalidade no tratamento controle permaneceu abaixo de 6,1% ao longo de todo o experimento e não apresentou diferenças significativas entre as avaliações (Análise de variância, F_{14 g.l.} = 1,803, P = 0,17).

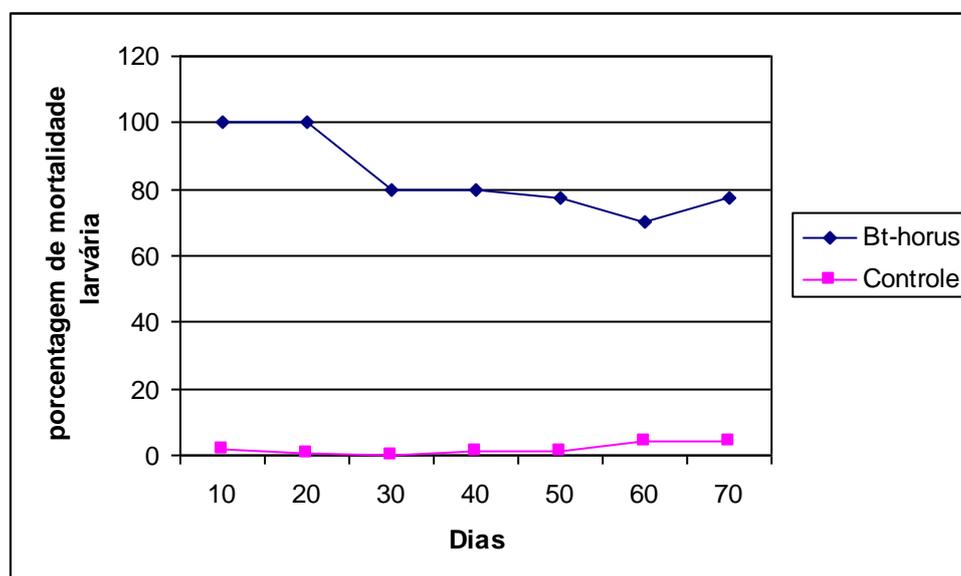


Figura 4: Porcentagem de mortalidade causada pelo produto formulado Bt-horus e controle ao longo de 70 dias de ensaio.

Trabalhos prévios realizados por Vilarinhos e Monnerat (2004) demonstraram que a utilização dos produtos Vectobac WDG (grânulos dispersíveis em água), DT (comprimidos) e CG (sabugo de milho) resultou em 100% de controle durante três, duas e uma semana,

respectivamente, em caixas d'água expostas a luz solar e nove, cinco e onze semanas quando as caixas d'água não estavam expostas à luz solar. Num outro trabalho, onde as condições utilizadas foram as mesmas em que o teste com o Bt-horus foi realizado, inclusive com reposição de água, as formulações WDG e DT controlaram 100% de larvas de *A. aegypti* resistentes e susceptíveis ao produto químico Temephos durante 20 dias (MONNERAT et al., 2006). Zequi et al. (2005) obtiveram o mesmo nível de controle em baldes semi-cobertos por 15 dias com o Vectobac WDG e T.

A incidência de raios solares parece ter um papel fundamental na eficácia e persistência dos biolarvicidas à base de Bt (MYASNIK et al., 2001), assim os componentes da formulação, sobretudo os protetores solares, exercem um papel fundamental na eficácia e persistência desses produtos, independentemente deles serem apresentados como suspensões concentradas, pós, grânulos ou comprimidos.

Os dados apresentados nesse trabalho indicam que a formulação do Bt-horus é tão eficaz quanto as demais formulações. Este produto está registrado na Agencia Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS) e é mais uma ferramenta que está disponível para ser utilizada nos programas de controle da dengue.

Referências

BRAVO, A., S.; SARABIA, LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in *Mexican Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

CERÓN, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.

HABIB, M. E. M.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A. Padronização de inseticidas microbianos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 779-798.

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

KUO, J.; FOX, E.; MACDONALD, E. S. **Sigmastat**: statistical software for working scientists: users manual. San Francisco: Jandel Scientific, 1992.

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

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

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTTO, 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**, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MARTINS, E.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SILVA WERNECK, J. O.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, Orlando, US, v. 40, p. 65-68, 2007.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P.; MARTINS, E.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, Orlando, US, v. 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G.; DIAS, D. G. S.; SILVA, S. R. da; MARTINS, E. S.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 2, p.103-106, 2005.

MONNERAT, R. G.; DUMAS, V. F.; ROSA, F. R.; PIMENTEL, L. W.; NUNES, A. C.; MEDEIROS, P. T.; SUJII, E. R.; VILARINHOS, P. **Avaliação de diferentes larvicidas para controle do *Aedes Aegypti* em simulação das condições de campo**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 123).

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; SILVA WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60).

MONNERAT, R. G.; SILVA, S.; DIAS, D.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; JONES, G.; SOARES, C. M.; DIAS, J. M. C. S.; BERRY, C. Screening of high toxic Brazilian *Bacillus sphaericus* strains against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, DE, v. 128, p. 469-473, 2004.

MULLA, M. S.; THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; CHOMPOOSRI, J. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, US, v. 20, n. 1, p. 64-73, 2004.

MYASNIK, M.; MANASHEROB, R.; BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; MARGALITH, Y.; BARAK, Z. **Current Microbiology**, New York, US, v. 43, n. 2, p. 140-143, 2001.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Metodologia de criação de insetos para a avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. israelensis crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, London, GB, v. 60, p. 181-197, 1983.

VILARINHOS, P. T. R. Dengue transmission and *Ae. aegypti* control in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35.; 2002, Foz do Iguassu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p. 55-57. Embrapa Soja. Documentos, 184; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 74).

VILARINHOS, P. T. R.; MONNERAT, R. G. Larvicidal persistence of *Bacillus thuringiensis* israelensis formulations to control *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, US, v. 20, n. 3, p. 311-314, 2004.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, US, v. 40, p. 549-576, 1986.

WORLD ORGANIZATION HEALTH. **Informal consultation on the envelopment of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide**. Geneva, 1985. 24 p. (Special Programme for Research and Training in tropical Diseases, TDR/BCV/SPHAERICUS/85 3).

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, [S.l.], v. 3, p. 315-343, 1984.

ZEQUI, J. A. C.; VILAS-BOAS, G.; LOPES, J.; ARANTES, O.; SANTOS, F. Eficácia e persistência de dois formulados de *Bacillus thuringiensis* subesp. israelensis no controle de *Aedes aegypti* em condições simuladas de campo. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife. **Anais...** Recife: FIOCRUZ, 2005. p. 194-194.