

Testes ecotoxicológicos de diferentes formulações do bioinseticida produzido na UNIVILLE submetidas ao teste de prateleira

Ecotoxicological testing of different formulations of bioinsecticide produced at UNIVILLE subjected to a shelf test

Adriana Ramos Arcy¹, Millena da Silva², Tatiana Leitzke Cunha³

RESUMO

O larvicida à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* é utilizado para combater mosquitos e simuliídeos atingindo o sistema digestivo de larvas do mosquito levando-as à morte. É importante conhecer a dose letal dos produtos (DL_{50}) para os insetos alvo, bem como seu grau de ecotoxicidade (C_{EC}) ao ambiente durante cada fase de caracterização dos produtos para estabelecer valores que não venham a ocasionar a morte ou intoxicação de outros seres vivos. O presente trabalho objetivou a determinação da DL_{50} através de bioensaios com larvas de *Aedes albopictus*, bem como o C_{EC} com a utilização de testes agudos com o microcrustáceo *Daphnia similis* para o larvicida com diferentes formulações expostas ao teste de prateleira. A amostra que apresentou melhor valor para C_{EC} foi B1 (sem aditivos) e para DL_{50} foi B2 (com cafeína na composição), sendo esses valores de 3526.000 e 16,815 mg.L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: bioinseticida; bioensaios; ecotoxicologia.

ABSTRACT

The larvicide based on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is used to eliminate mosquitoes and simuliidae, acting on the larvae digestive system causing death. It is important to know the lethal dose (LD_{50}) for the target insects and the environment ecotoxicity degree (C_{EC}) during each characterization phase of the products in order to establish values that do not cause death or intoxication for other living beings. This article aimed to find the DL_{50} by bioassays with larvae of *Aedes albopictus*, as well as the C_{EC} using acute tests with the microcrustacean *Daphnia similis* for the product with different formulations exposed to a shelf test. The sample that showed the best C_{EC} value was the B1 (without additives) and for LD_{50} it was the B2 (with caffeine in composition) that showed the following values: 3526.000 and 16.815 mg.L⁻¹, respectively.

Keywords: bioinsecticide; bioassay; ecotoxicology.

INTRODUÇÃO

Doenças ocasionadas por vetores são consideradas uma importante causa da mortalidade no Brasil e no mundo, principalmente as ocasionadas por mosquitos. Esses insetos se reproduzem de maneira muito rápida e em grande número, podendo se tornar pragas que podem atingir diretamente a população se medidas cabíveis não forem tomadas.

Práticas para controle de insetos são muito antigas. Há registros de seu uso na China há mais de dois mil anos. Para o controle de pragas é utilizada uma classe de agrotóxicos denominada de inseticidas (DAROS *et al.*, 2009). Na década de 1940 foram descobertos os inseticidas sintéticos, constituídos à base de substâncias

químicas orgânicas e inorgânicas. A criação desses inseticidas foi considerada pelo mundo uma revolução no controle de mosquitos vetores de doenças. Porém, o que não se sabia é que os resultados dessas aplicações teriam como consequência a contaminação do solo, águas superficiais e águas subterrâneas, vindo a tornar esses recursos inviáveis para o uso humano e animal. Outro efeito da utilização prolongada de inseticidas sintéticos é a geração de resistência por parte dos organismos alvos, resultando na redução da eficiência do produto. Segundo Pacheco (2009), no Brasil, todos os agrotóxicos devem seguir a Lei Federal nº 7.802/1989 e estar registrados obrigatoriamente na Agência Nacional de Vigilância

¹Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) - Joinville (SC), Brasil.

²Departamento de Engenharia Ambiental e Engenharia Química da UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil.

³Professora da UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil.

Endereço para correspondência: Adriana Ramos Arcy - Rua General Canabarro, 36 - 97700-000 - Santiago (RS), Brasil - E-mail: arcy.adriana@gmail.com

Recebido: 20/10/12 - **Aceito:** 11/07/14 - **Reg. ABES:** 676

Sanitária (ANVISA) e no Ministério da Agricultura para que seja possível um monitoramento de seus usos.

A partir da década de 1980 começaram a surgir pesquisas na busca de novas alternativas para o controle de insetos com diferentes modos de ação. Uma dessas alternativas foi a utilização de inseticidas biológicos à base de bactérias como *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Conforme descrito por Stahly *et al.* (2006), a descoberta do Bti foi feita em 1902 por Ishiwata, no Japão. No entanto, os primeiros registros foram escritos por Berliner em 1915, na Thuringia, Alemanha.

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Berliner) é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada no solo. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas chamadas endotoxinas ou *insecticidal crystal proteins* (ICPs), que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos polos da célula (LERECLUS, 1988; HOFTE & WHITELEY, 1989; PEFRÖEN, 1997 *apud* BOBROWSKI *et al.* 2003).

De acordo com Souza Dias (1992), os produtos mais usados à base de Bti para controle de mosquitos e simulídeos que estão disponíveis no mercado brasileiro são: Vectobac, Bactimos, Teknar e Skeetal. Já existem outros produtos no mercado, mas eles ainda não são comercializados em grande escala. O Rio Grande do Sul foi pioneiro no uso de Bti no Brasil. O Programa de Controle de Simulídeos (PCS) utilizando o bioinseticida foi iniciado em 1983 com o objetivo de controlar populações resistentes de *Simulium pertinax* (RUAS & MATIAS, 1985).

O uso do Bti se mostra muito efetivo no combate à simulídeos e mosquitos, porém possui algumas falhas. Para que o efeito sob o controle dos insetos seja eficaz é necessária a melhoria constante dos produtos no mercado. A adição de componentes que venham a auxiliar na efetividade dos bioinseticidas é uma alternativa interessante e viável, mas sempre se deve preservar a característica de segurança ao meio ambiente e ao homem que esses produtos visam oferecer. Adicionar cafeína na formulação do bioinseticida Bti é uma das alternativas. Estudos demonstram que essa substância altera a produção das esterases no organismo das larvas. Essas enzimas estão envolvidas em funções vitais do mosquito, ocasionando sua mortes. Inúmeras pesquisas com extratos de plantas produzidas em diferentes locais têm sido divulgadas pela mídia de maneira crescente, todas com o objetivo de realizar o controle do mosquito na fase larval (GUIRADO & BICUDO, 2009). Uma das alternativas pode ser a clorofila, que é encontrada em abundância e é de fácil extração. Neste sentido, Fisher *et al.* (2010) classificou a adição de clorofila na composição do bioinseticida como uma alternativa favorável na busca de formulações que viessem a aumentar a efetividade do produto.

Muitos progressos têm sido feitos na área de produção de bioinseticidas, porém, antes que esses produtos cheguem ao mercado, suas

características devem ser conhecidas. Uma das etapas de caracterização é o teste de prateleira, no qual o produto é estocado à temperatura ambiente e protegido da radiação solar. São observadas as reações ocasionadas por esses fatores sobre as características do produto após tempos de exposição pré-determinados, obtendo-se, assim, a melhor forma de armazenamento e o tempo de validade. Para garantir a segurança na aplicação dos novos produtos é necessário conhecer seus efeitos ao longo dos períodos de teste, tanto para o inseto alvo, determinando a dose letal (DL_{50}), como também sua concentração crítica de ecotoxicidade (C_{EC}).

De acordo com Soares (1991 *apud* BOTELHO, 2010), a preocupação em monitorar a ação antrópica levou à criação da ecotoxicologia, ciência que estuda os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, especialmente nas populações e nas comunidades de um ecossistema definido, incluindo os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente. Nos estudos de ecotoxicologia, organismos representativos do ambiente são expostos a várias concentrações do efluente ou da substância potencialmente tóxica a ser testada, por um período determinado.

Como uma ferramenta em ecotoxicologia, ensaios ecotoxicológicos consistem em fornecer informações relevantes e fiáveis sobre os efeitos de produtos químicos e biológicos sobre essas comunidades. Biotestes ou bioensaios são baseados na resposta de um estímulo a um organismo vivo, o que poderia ser, por exemplo, a exposição a uma determinada toxina. É possível usar algas, protozoários, bactérias, peixes e invertebrados como organismos-teste (HÄDER & RICHTER, 2009).

Em testes agudos são observadas a letalidade e a imobilidade em um curto período de tempo, geralmente de 24 a 48 horas. O resultado do teste é expresso em concentração efetiva inicial mediana (CE_{50}) e DL_{50} , que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos em 48 horas, nas condições de teste (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Segundo consta no manual da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2007), a escolha adequada do método a ser utilizado em cada estudo dependerá dos objetivos do trabalho, pois em alguns casos é necessário introduzir modificações no procedimento padronizado ou desenvolver outro mais específico. Os testes devem ser feitos em pelo menos três níveis tróficos para que se possa ter um parâmetro abrangente de avaliação.

No presente trabalho objetivou-se determinar a DL_{50} por meio de bioensaios, com larvas do organismo *Aedes albopictus*. Também buscou-se definir o grau de ecotoxicidade (C_{EC}) com a utilização de testes agudos com o microcrustáceo *Daphnia similis*, do produto bruto centrifugado (B1), do produto formulado com adição de cafeína (B2) e do produto formulado com adição de clorofila (B3) expostos ao teste de prateleira.

METODOLOGIA

O produto utilizado nos testes, denominado Bti-Univille, foi obtido em laboratório utilizando o processo de fermentação em biorreator, aperfeiçoado anteriormente pelo grupo de pesquisa.

O microrganismo utilizado no cultivo foi o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS 82, sorotipo H14.

O meio de cultivo utilizado no fermentador foi o meio GYS proposto por Saar (1996), modificado, contendo extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e glicose.

A fermentação foi feita por meio do método proposto por Silva (2007), com cultivo submerso em regime semicontínuo. O sistema inclui as instalações necessárias para o controle de pH (mantido em 7,0), temperatura (30°C), agitação (450 a 750 rpm) e aeração (0,5 vvm). O caldo fermentado foi submetido ao processo de centrifugação.

As formulações foram feitas a partir da formulação base proposta por Fisher *et al.* (2010), que contém quantidades pré estabelecidas de óxido de zinco (Aerosil®), éster de sorbitol e lecitina de soja, conforme expresso na Tabela 1.

Para a amostra B2, foi adicionado 40 g.L⁻¹ de cafeína pura, em pó. Para a amostra B3, foi adicionado 5 mL de clorofila líquida, concentração de 3 µg.mL⁻¹.

Os bioensaios para determinação da DL₅₀ foram realizados com larvas de 4º instar do mosquito *Aedes albopictus*. Os ovos desse inseto foram cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O método utilizado para os bioensaios foi o proposto por Draft (WHO, 1999), descrito em *Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use*.

Através do programa estatístico Probit determinou-se a DL₅₀, concentração letal do produto para matar 50% da população larval empregada em cada análise.

Para os testes de ecotoxicidade aguda foi utilizado o procedimento recomendado pela NBR 12713 (ABNT, 2004), sendo o organismo teste o microcústáceo *Daphnia similis*. A C_{EC} (concentração crítica de ecotoxicidade para eliminar 50% da população) foi determinada através de métodos estatísticos utilizando o programa Probit. Os organismos utilizados nos testes de C_{EC} foram cultivados no laboratório de ecotoxicologia da UNIVILLE.

Tabela 1 - Componentes da formulação base.

Reagente	Quantidade
Óxido de zinco (Aerosil®)	1,2 g
Éster de sorbitol	6 g
Lecitina de soja	6 g
Líquido	26,74 mL
Cultivo centrifugado úmido	80 mL

Fonte: Fischer *et al.* (2010).

Os testes de prateleira foram divididos em duas etapas:

- **Primeira etapa:** amostras de 80 mL de produto formulado com cafeína (B₂) e clorofila (B₃), como também o produto bruto centrifugado (B₁) foram acondicionadas em frascos transparentes, de plástico, e armazenadas em prateleiras disponíveis no Laboratório de Pesquisa da UNIVILLE, em temperatura ambiente, sem antes passar por nenhum processo de desinfecção. As amostras foram retiradas de cada frasco e conduzidas aos testes para determinação da DL₅₀ e C_{EC}. Os testes foram realizados em três períodos: no primeiro dia de formulação (T_{0,1}), 30 dias após a formulação (T_{1,1}) e 60 dias após a formulação (T_{2,1}). Sendo que o T_{0,1} significa o tempo zero (T₀) da primeira etapa.
- **Segunda etapa:** para cada produto formulado com cafeína (B₂), clorofila (B₃) e produto bruto centrifugado (B₁), foram feitas 3 amostras de 20 mL cada, acondicionadas em frascos brancos, de plástico e estéreis. Todos os frascos foram submetidos ao processo de pasteurização (em banho-maria a 70°C) após a etapa de formulação e envolvidos por papel laminado para que não recebessem incidência de luz. Para cada teste de DL₅₀ e C_{EC} uma nova amostra era aberta, para que a interferência de microrganismos externos fosse remota. Nessa etapa, os testes também foram realizados em três períodos: no primeiro dia de formulação (T_{0,2}), 30 dias após a formulação (T_{1,2}) e 60 dias após a formulação (T_{2,2}). Sendo que o T_{0,2} significa o tempo zero (T₀) da segunda etapa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeira etapa do teste de prateleira

Os testes de DL₅₀ não demonstraram nenhuma efetividade do produto, sendo que não foi constatada a ocorrência de morte das larvas mesmo após um período de 48 h de exposição. Em relação aos testes de ecotoxicidade, os valores muito divergentes de morte dos organismos-teste não permitiram uma análise dos resultados através do programa Probit. Devido aos fatores acima mencionados, acredita-se que as amostras possuíam características tóxicas aos organismos no teste de C_{EC} e não possuíam nenhuma característica tóxica aos organismos alvo nos testes de DL₅₀, fator esse que pode ter ocorrido devido, principalmente, à baixa produção de toxinas Cry no momento da produção do bioinseticida, como também, à decomposição do produto. Quanto às características físicas das amostras, no momento da formulação, B1 e B2 apresentavam odor característico e coloração marrom claro, já B3 apresentava coloração esverdeada, característica da clorofila. Após 30 e 60 dias na prateleira, os produtos mostraram grande alteração na cor e odor. Ficando B1 e B2 amarelo ocre e B3 marrom.

Segunda etapa do teste de prateleira

Como os resultados obtidos anteriormente não foram satisfatórios e as amostras apresentaram características de decomposição, foram analisados possíveis fatores que poderiam ter influenciado diretamente nas características do produto. Foi considerado que a incidência de luz e a interferência de microrganismos externos poderiam estar agindo e acelerando a decomposição das amostras. Por isso, foram feitos novos ensaios com a pasteurização do produto e proteção da luz solar.

O resultado para os ensaios no primeiro tempo de amostragem, logo após a formulação, não apresentaram os mesmos problemas verificados na primeira etapa. A amostra que apresentou melhor resultado para C_{EC} em $T_{0,2}$, $T_{1,2}$ e $T_{2,2}$ foi a do produto bruto centrifugado (B1), conforme a Tabela 2, na qual encontram-se expostos os resultados da C_{EC} para os produtos testados, observando-se um aumento constante da C_{EC} ao longo do teste de prateleira, com uma diferença de aproximadamente 610% entre 0 e 60 dias de estocagem. Após 30 e 60 dias de estocagem ($T_{1,2}$ e $T_{2,2}$), a C_{EC} de B2 aumentou aproximadamente em 36 e 880% e de B3 em 29 e 189%, respectivamente, em relação ao $T_{0,2}$.

Observando-se, assim, que o maior aumento da concentração específica (C_{EC}) após 60 dias foi na amostra B1, porém todas as amostras apresentaram grande porcentagem de aumento, o que evidencia que a toxicidade do produto para o organismo *Daphnia similis* diminuiu ao longo do teste, demonstrando que o mesmo oferecerá segurança em sua aplicação dentro de um prazo de 60 dias estocado em prateleira, porém protegido da incidência de luz e de microrganismos externos.

Os resultados do teste de DL_{50} expressos na Tabela 3 demonstram que para o produto B1, a DL_{50} aumentou aproximadamente 58,76% comparando o $T_{1,2}$ em relação ao $T_{0,2}$ e diminuiu 17,31% em $T_{2,2}$. Já para B2 e B3, ocorreu uma diminuição de 36,5 e 18,4%, respectivamente, após os 30 dias de armazenamento na prateleira e 14,75 e 7,92% após 60 dias.

Tabela 2 - Resultados do teste de concentração crítica de ecotoxicidade, segunda etapa do teste de prateleira.

Produto	C_{EC} (mg.L ⁻¹)
B1	
$T_{0,2}$	497
$T_{1,2}$	602
$T_{2,2}$	3526
B2	
$T_{0,2}$	97
$T_{1,2}$	132
$T_{2,2}$	950
B3	
$T_{0,2}$	244
$T_{1,2}$	316
$T_{2,2}$	706

C_{EC} : concentração crítica de ecotoxicidade.

Em $T_{0,2}$ o produto que apresentou melhor valor da DL_{50} foi B1, porém os produtos B2 e B3 apresentaram melhoras na efetividade do produto entre $T_{0,2}$ e $T_{2,2}$, no qual B1 chegou a apresentar aumento nos valores. No entanto, ao final dos testes a melhor DL_{50} observada foi a do produto B2. É importante salientar que quanto menor a DL_{50} do produto, melhor é a ação dele contra o organismo alvo.

Compilando os dados acima, pode-se observar que ocorre um decréscimo relativamente pequeno na efetividade do produto ao longo do tempo de estocagem, demonstrando, assim, que mesmo não apresentando sinais de decomposição, a amostra sofre alterações em suas características tóxicas ao organismo alvo.

Na segunda etapa do teste de prateleira, no tempo $T_{1,2}$, após 30 dias na prateleira, as amostras não mostraram alteração no odor, que permaneceu característico do produto, assim como no momento da formulação. Quanto à cor, a única amostra que apresentou modificação foi a B3, que passou de verde para marrom. Acredita-se ter havido decomposição da clorofila, já que essa amostra (B3) apresentou os piores resultados para DL_{50} . Já no tempo $T_{2,2}$, após 60 dias na prateleira, todas as amostras demonstraram alteração no odor e na consistência, ficando ambas com cheiro perceptivelmente mais forte, a amostra B1 mais líquida e B2 e B3 mais consistentes. A cor das amostras não sofreu alteração perceptível.

Com os resultados expressos nas Tabelas 2 e 3 e os resultados da primeira etapa de testes, pode-se observar que a incidência de luz e a interferência de microrganismos externos afetam as características do produto, acelerando a decomposição das amostras e interferindo em suas características tóxicas.

Segundo Praça *et al.* (2004), a DL_{50} do produto bruto, sem formulação, de estirpes de *Bacillus thuringiensis israelensis* para larvas de *Aedes aegypti* é de 0,001 mg.L⁻¹. Conforme pesquisa realizada por Beltrão (2006), a DL_{50} de Bti nativo, liofilizado padrão IPS-82, sob larvas do mosquito *Aedes aegypti*, foi de 0,002 mg.L⁻¹.

Tabela 3 - Resultado dos testes de dose letal, segunda etapa do teste de prateleira.

Produto	DL_{50} (mg.L ⁻¹)
B1	
$T_{0,2}$	16,81
$T_{1,2}$	26,212
$T_{2,2}$	22,343
B2	
$T_{0,2}$	31,064
$T_{1,2}$	19,726
$T_{2,2}$	16,815
B3	
$T_{0,2}$	104,692
$T_{1,2}$	85,437
$T_{2,2}$	78,669

DL_{50} : dose letal.

Em outra pesquisa, Souza Dias (1992) realizou testes para determinação de DL_{50} utilizando larvas de *Culex*, a DL_{50} obtida foi de 0,0599 $mg.L^{-1}$. Todos esses resultados são muito superiores à média do produto B1, que apresentou melhor valor de DL_{50} nos testes realizados por este trabalho.

Já em ensaios realizados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (DIAS *et al.*, 2002) utilizando Bti, a DL_{50} para larvas de *Aedes aegypti* foi de 1,06 $mg.L^{-1}$, resultado que mais se aproximou do valor de DL_{50} médio obtido pelo produto B1. Os autores não apresentaram valores de C_{EC} para nenhum dos compostos, não sendo possível fazer a avaliação com relação à segurança ambiental dos produtos testados na literatura com relação às amostras do trabalho.

Embora a DL_{50} de B1, B2 e B3 estejam bem abaixo das analisadas pelos autores, essas amostras demonstram efetividade do produto contra o inseto alvo sem, contudo, afetar o ecossistema local. A diferença pode ocorrer devido às diversas formas de obtenção do produto, à origem das cepas, e às formulações nas quais podem ser utilizados produtos que otimizem a eficiência do produto final, como por exemplo compostos químicos. Porém, o uso desses aditivos pode alterar diretamente a toxicidade do produto agregando características negativas a ele com relação à segurança do homem e do meio ambiente.

CONCLUSÃO

Após a observação dos resultados, pode-se observar que a decomposição das amostras interfere diretamente em suas propriedades, diminuindo a ação do bioinseticida sob as larvas do mosquito *Aedes albopictus*. Muitos podem ser os fatores que podem ter levado à ocorrência dos erros no primeiro teste de prateleira, como contaminação das amostras por outros microrganismos ou até mesmo a incidência de luz.

Outro aspecto relevante pode ser a quantidade de cristais protéicos presentes nas amostras, responsáveis pela morte das larvas. A quantidade desses cristais está diretamente ligada ao processo de fermentação de onde o produto é originado, como também à integridade da cepa, abrindo assim uma gama de fatores que podem ter influenciado diretamente nos resultados.

Outro fator relevante é a influência da temperatura, pois ambas as amostras não foram refrigeradas, ficando em ambiente com temperatura entre 20 e 25°C, temperatura esta que não impede que o Bti continue ativo e provavelmente fermentando a amostra.

Observou-se que a esterilização dos frascos, pasteurização das amostras e proteção contra a incidência de luz apenas reduzem a decomposição das amostras ou até mesmo amenizam os efeitos que a decomposição acarreta, porém não modificam o fato das amostras entrarem em decomposição. Devido a isso, devem ser realizados posteriormente testes de geladeira, onde as amostras sejam acondicionadas após esterilização com proteção contra incidência de luz sob temperaturas baixas para verificação da interferência direta da temperatura na estocagem do produto.

Com relação à efetividade do produto e seu grau de ecotoxicidade para organismos da cadeia alimentar, pode-se observar que, apesar de ocorrer um aumento nos valores de DL_{50} após 60 dias na prateleira, eles ainda demonstram valores positivos, determinando a eficiência da ação dos produtos sob as larvas do mosquito *Aedes albopictus*. Para ambas as amostras, a diferença entre os valores finais de DL_{50} : B1 (22,343), B2 (16,815) e B3 (78,669); e C_{EC} : B1 (3.526), B2 (950) e B3 (706) é relativamente grande para todos os compostos testados, assegurando, assim, uma boa margem de segurança, ou seja, sem oferecer riscos ao meio ambiente com relação à toxicidade do produto quando a aplicação for feita em até 60 dias de estocagem sob condições adequadas.

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. (2004) NBR 12713. Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT; 2004.
- BELTRÃO. H.B.M. (2006) *Interação das toxinas Cry do Bacillus thuringiensis svar. israelensis com o mesêntero de larvas do vetor Aedes aegypti (Diptera: culicidae)*. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife.
- BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. (2003) Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 843-850.
- BOTELHO, R.G. (2010) *Toxicidade de herbicidas para Escherichia coli e alevinos de Ctenopharyngodon idella*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Vale Do Rio Doce, Governador Valadares.
- DAROS, W.F.; RIEDER, A.; RODRIGUES, F.A.C.; MACEDO, P.C.; LEITE, M.C.; MELÃO, A.V. (2009) Classes de agrotóxicos usados nas plantações de soja (*Glycine max* (L.) Merr. - Fabaceae) Cáceres, Mato Grosso. In: *2ª Jornada Científica da Unemat*. Barra do Bugres: Universidade do Estado do Mato Grosso.

DIAS, D.G.S.; SILVA, S.F.; MARTINS, E.S.; SOARES, C.M.S.; FALCAO, R.; GOMES, A.C.M.M.; PRACA, L.B.; DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G. (2002) Boletim de pesquisa e desenvolvimento 30: prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos. Brasília: EMBRAPA. 23 p.

FISHER, G.A.; VENTURA, P.; SILVA, M.; SOUZA, O. (2010) Formulação, determinação da Dose Letal (DL_{50}) e ensaio ecotoxicológico do bioinseticida Bti. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Foz do Iguaçu: COBEQ.

GUIRADO, M.M & BICUDO, H.E.M.C. (2009) Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 6, n. 64.

HÄDER, D.P. & RICHTER, P. (2009) *Curso avançado de biologia marinha: experimentos ecofisiológicos*. São Francisco do Sul: Universidade da Região de Joinville (Univille).

MAGALHÃES, D.P. & FERRÃO FILHO, A.S. (2008) A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 355-381.

PACHECO, P. (2009) *Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos*. Estadão: Economia. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/geral/brasil-lidera-uso-mundial-de-agrotoxicos414820>>. Acesso em: 10 maio 2011.

PRAÇA L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, É.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. (2004) Estirpes de

Bacillus thuringiensis efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 1, p. 11-16.

RUAS, A.L. & MATIAS, R.S. (1985) Controle integrado do *Simulium* (*Chirostilbia*) *pertinax* Kollar, 1832: a competição interespecífica como possível método de controle natural. *Boletim da Saúde*, v.4, n.2, p.21-24.

SAAR, J.H. (1996) *Biotestes para efluentes industriais: ameaça ou solução?* Artigo Técnico. Blumenau: UMWELT Ltda. Disponível em: <http://www.tratamentodeagua.com.br/R10/Lib/Image/art_629651847_umwelt.pdf> Acesso em: 10 jun. 2011.

SILVA, M. (2007) *Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SOUZA DIAS, J.M. (1992) Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 59-76.

STAHLY, D.; ANDREWS, R.E.; YOSTEN, AA. (2006) The genus *Bacillus* - insect pathogens. In: DWORKIN, M. (Ed.) *The Prokaryotes*. Singapore: Springer Science. vol. 4, cap. 1.2.17, p. 563-608.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1999) DRAFT Guideline Specifications for bacterial larvicides for public health use. Annex 1 - Determination of the Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. sphaericus* products. Geneva: WHO. p. 29-33.