

CONTROLE DE INSETOS: UMA BREVE REVISÃO

CHRISTINE LAMENHA LUNA FINKLER

*Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória,
Vitória de Santo Antão, Pernambuco.*

RESUMO

CONTROLE DE INSETOS: UMA REVISÃO

A utilização indiscriminada dos defensivos químicos e suas conseqüências danosas ao meio ambiente impulsionaram o desenvolvimento de técnicas de controle biológico no combate a insetos prejudiciais, tanto na agricultura, como em saúde pública. Dentre os procedimentos empregados para o manejo integrado de pragas, o controle biológico se destaca pelas vantagens que apresenta, particularmente especificidade e inocuidade para o homem.

Termos para indexação: controle químico, controle biológico, *Bacillus*.

ABSTRACT

INSECT CONTROL: A BRIEF REVIEW

The indiscriminate use of chemical pesticides and their harmful consequences to the environment prompted the development of biological control techniques against harmful insects, both in agriculture and public health. Among the procedures employed for the integrated pest management, biological control is underscored by the advantages they offer, particularly specificity and safety for man.

Index terms: chemical control, biological control, *Bacillus*.

1. INSETOS

Os insetos são animais altamente especializados e evoluídos, facilmente adaptáveis às mais variadas e surpreendentes condições de vida. Pertencem ao filo dos artrópodes, compreendendo mais de um milhão de espécies já descritas (Alves, 1998).

A maioria das espécies é benéfica ou útil ao homem, sendo importantes para

o equilíbrio dos ecossistemas através da polinização de plantas, decomposição de matéria orgânica, participação ativa no equilíbrio biológico, produção de cera, mel, seda, melhoramento das condições do solo e fonte de alimento para peixes, anfíbios, répteis, pássaros, etc.

Apenas de cinco a quinze mil espécies são consideradas nocivas, embora um número dez vezes maior possa vir a se tornar praga devido a alterações no equilíbrio populacional (Bull & Hathaway, 1986). Estas espécies possuem grande importância epidemiológica, pois atuam como vetores de transmissão de doenças ao homem. Dentre as principais atividades do homem que favoreceram o aumento populacional de alguns insetos, destacam-se o desmatamento, monoculturas, criação intensiva de animais, superpopulação humana, condições inadequadas de escoamento de águas e de remoção de dejetos e lixos, precárias condições de moradia, alimentação, vestuário e higiene. Dessa forma, encontrando um ambiente propício, com poucos competidores, sem barreiras, alimento fácil e abundante, algumas espécies se reproduziram com facilidade, tornando-se pragas para saúde pública, agricultura e pecuária.

Dentro da classe dos insetos, os Dípteros (mosquitos) se destacam como vetores biológicos pela transmissão de doenças como as arboviroses (dengue e febre amarela), filariose (elefantíase), malária e oncocercose.

Estes animais pertencem à Família *Culicidae*, sendo conhecidos também como pernalongos, muriçocas ou carapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto. Os principais gêneros de mosquitos causadores de doenças são *Anopheles* (transmissor da malária), *Culex* (transmissor da filariose), *Simulium* (transmissor da oncocercose) e *Aedes* (transmissor da dengue e da febre amarela).

a) *Anopheles*

Mosquito transmissor da malária, causada por parasitos do gênero *Plasmodium*. No Brasil, cinco espécies são consideradas os principais vetores: *Anopheles darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. cruzi* e *An. bellator*. Segundo Deane (1986), o *An. darlingi* é o vetor mais importante em áreas no interior do país, do nordeste até o norte do Estado do Paraná, enquanto que o *An. aquasalis* está presente ao longo da costa brasileira.

No século XX, um dos principais eventos relacionados ao controle de vetores ocorreu em 1955, através do primeiro Programa Global de Erradicação da Malária,

com grande utilização do inseticida químico DDT. Em todo o mundo, foram observadas reduções no número de casos da doença nos anos de 1961 e 1962; posteriormente, uma grande reincidência das populações de *Anopheles* foi ocasionada principalmente pela resistência do mosquito a este inseticida (Régis *et al.*, 2000).

b) *Culex*

O mosquito *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor da filariose linfática no Brasil, transmitida pelo verme *Wuchereria bancrofti*.

A Figura 1 ilustra o ciclo de vida do mosquito *Culex quinquefasciatus*.

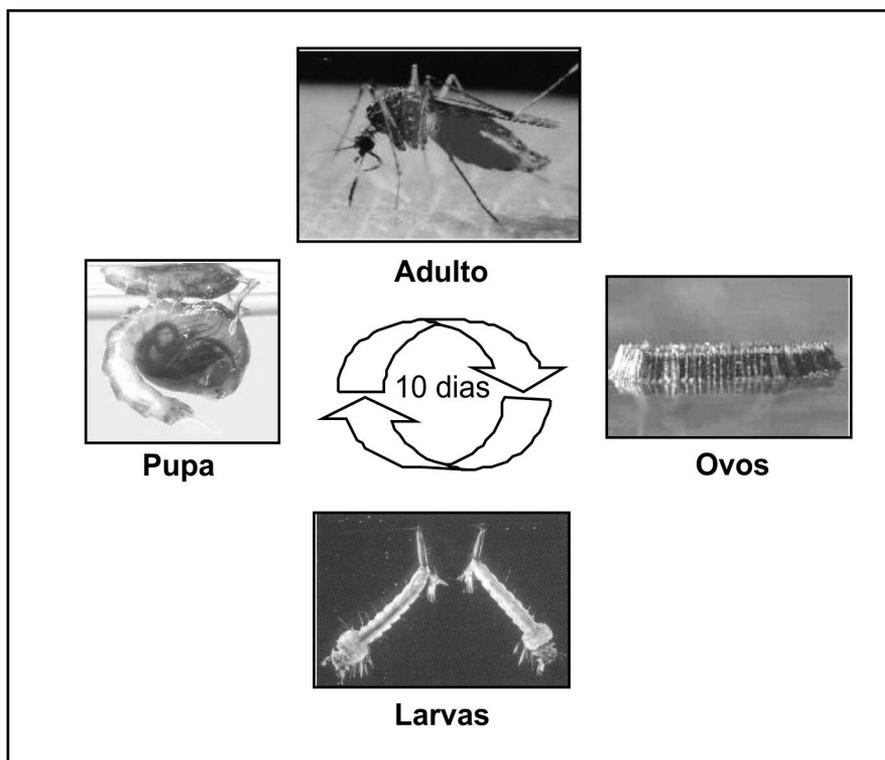


Figura 1. — Ciclo de vida do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Ilustração gentilmente cedida pelo Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ)

c) *Simulium*

Várias espécies de mosquitos do gênero *Simulium* são transmissoras de uma doença parasitária crônica denominada oncocercose, tendo como agente etiológico o nematoide *Onchocerca volvulus*. A doença pode causar danos oculares e cegueira.

O caráter endêmico da doença foi confirmado em 1974, através de pesquisas

epidemiológicas realizadas no Amazonas. Esta tem se mantido restrita ao território de comunidades indígenas da região (Rabinovitch *et al.*, 1999).

d) *Aedes*

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue e febre amarela.

A dengue é uma doença cujo agente infeccioso é um arbovírus e clinicamente pode se apresentar sob duas formas: dengue clássica e dengue hemorrágica. É a virose urbana mais difundida no mundo, presente em todos os continentes com exceção da Europa, sendo típica de áreas tropicais e subtropicais. A transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito e os criadouros encontram-se, em geral, em lugares onde existe acúmulo de água parada. As fêmeas depositam seus ovos sobre a superfície líquida ou em substratos úmidos, próximos à água ou em locais inundáveis. Os criadouros são transitórios, condicionados diretamente pelas chuvas. Atualmente, sabe-se que os ovos também podem ser depositados em águas ou criadouros que contêm matéria orgânica e material em suspensão.

Há registros da doença no Brasil desde 1846, quando uma epidemia atingiu as cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador. Somente em 1982, com uma epidemia em Boa Vista (RO), foi isolado pela primeira vez o vírus da dengue no país (sorotipos 1 e 4) (Nobre *et al.*, 1994).

Em 1986, a doença reapareceu de forma epidêmica nos estados do Ceará, Alagoas e Rio de Janeiro, atingindo neste último mais de 1 milhão de pessoas. Casos também foram registrados na Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Em 1990, surgiram os primeiros casos de dengue hemorrágica no Rio de Janeiro, com a introdução de um novo sorotipo, o Den 2.

Atualmente há circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus em 22 Estados brasileiros, o que potencializa o risco de surgimento de epidemias de febre hemorrágica da dengue, especialmente nas grandes metrópoles que já tiveram epidemias por dois sorotipos. A doença tem sido objeto de uma das maiores campanhas de saúde pública realizadas no país. O controle da transmissão da doença exige um esforço de toda a sociedade, em virtude da elevada capacidade de adaptação e transmissão do seu vetor.

A febre amarela urbana também é transmitida por meio do mosquito *Aedes aegypti*, cujo agente etiológico também é um arbovírus. Ao contrário da dengue, existe vacina contra a doença, oferecendo altos níveis de proteção e garantindo imunidade por pelo menos 10 anos (Nobre *et al.*, 1994).

2. CONTROLE QUÍMICO

Desde o início do século vinte, todo o controle de insetos vetores de doenças ou pragas na agricultura era feito através da utilização de inseticidas químicos. Os primeiros produtos desenvolvidos foram à base de compostos arsênicos, seguindo-se dos compostos organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides.

Entretanto, muitos problemas associados ao uso indiscriminado destes inseticidas de amplo-espectro foram se evidenciando ao longo dos anos: são produtos de elevada toxicidade e que causam danos à saúde humana; os insetos têm adquirido resistência a estas substâncias, sendo necessárias doses cada vez mais elevadas de aplicação; possuem um amplo espectro de ação, eliminando os predadores naturais; sua persistência no meio ambiente, pois são substâncias que não se degradam com facilidade, acumulando-se nos ecossistemas.

As informações disponíveis sobre os problemas associados ao uso dos pesticidas químicos nos países em desenvolvimento são limitadas, considerando que existem dificuldades de monitoramento dos casos de danos causados pela exposição ocupacional ou pelos problemas causados pela estocagem inadequada destes produtos. Vale salientar que a maioria dos casos não são relatados, estimando-se que existem cerca de 50 casos para cada caso reportado.

A persistência no ambiente também é outro fator importante. Alguns produtos, como o DDT e compostos afins, são muito estáveis e se acumulam com facilidade no ambiente. Isto ocorre devido à impossibilidade do aproveitamento de suas estruturas pela maioria dos organismos. Além disso, a eficiência destes agentes tem diminuído consideravelmente devido ao aumento da resistência em insetos de importância médica e na agricultura (Singer, 1980), causado pelos processos de variação genética e de seleção natural. Dessa forma, dosagens cada vez mais elevadas destes agentes são empregadas, causando graves danos ao meio ambiente.

Face à crescente preocupação do público quanto à ocorrência de seus efeitos adversos e em virtude do aumento do rigor na legislação de alguns países quanto à presença de resíduos químicos em alimentos, torna-se necessário o uso de novas estratégias de controle a insetos prejudiciais.

No Brasil e no mundo, tem sido implementados métodos que não implicam no uso massivo de inseticidas, mas que são seletivos para as espécies de importância para a saúde pública e animal. Desta forma, o controle biológico apresenta grande potencial de uso como alternativa ao uso de produtos químicos.

3. CONTROLE BIOLÓGICO

A utilização de métodos biológicos para o controle de insetos tem sido relatada desde o primeiro milênio da nossa era, quando formigas eram usadas na China no controle de pragas de citrus (Coppel & Mertins, 1977).

O uso de métodos microbianos para a proteção de colheitas foi reconhecido no século 19. Aparentemente, o primeiro relato de uma doença animal causada por um microrganismo foi em 1834, quando Agostino Bassi observou uma doença do bicho-da-seda causada pelo fungo posteriormente conhecido como *Beauveria bassiana*. Em 1878, o russo Elie Metchnikoff realizou pesquisas sobre doenças no besouro *Anisoplia austriaca*, as quais resultaram na descoberta do fungo *Metarhizium anisopliae* (Stockdale, 1992).

O controle biológico possui uma definição bastante abrangente, e compreende todos os métodos que tem como objetivo biológico principal limitar o desenvolvimento de pragas, insetos vetores, doenças e plantas invasoras. Estes métodos podem ser divididos em quatro tipos:

- i) Controle biológico clássico: envolve a utilização de inimigos naturais;
- ii) Controle microbiano: utiliza micro-organismos (bactérias, fungos, vírus, protozoários, nematódeos) capazes de causar doenças em insetos ou de prevenir o estabelecimento de microrganismos causadores de doenças em plantas;
- iii) Modificadores de comportamento da praga: que exploram comportamentos específicos das pragas de forma a confundir-las ou alterá-las, conseguindo assim o seu controle (por exemplo, os feromônios);
- iv) Manipulação genética: técnica que possui a capacidade de interferir na reprodução do inseto, na imunização da planta ao ataque de insetos selecionados ou no aumento da atividade microbiana de controle da praga.

A utilização do controle biológico possui algumas vantagens, tais como (Alves, 1998): são produtos inócuos ao homem e a outros animais; possuem a capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente; produção de efeitos secundários às populações de insetos, como redução da oviposição, perda de viabilidade de ovos ou aumento da sensibilidade a outros agentes de controle; são produtos específicos ao inseto praga, não ocasionando efeitos maléficos aos inimigos naturais; possibilitam o estabelecimento de um controle permanente, de modo a manter a população da praga sob controle após sucessivas aplicações; podem ser utilizados em associação com os inseticidas químicos em subdosagens, possibilitando uma ação sinérgica e mais eficiente; os índices de aparecimento de resistência são baixos; podem ser

produzidos por processos fermentativos relativamente simples, utilizando-se matérias-primas de baixo custo.

O emprego de produtos de origem biológica para controle de insetos vetores e pragas da agricultura aumenta a qualidade do produto agrícola e reduz a poluição do meio ambiente, contribuindo para a preservação de recursos naturais e aumentando a sustentabilidade dos ecossistemas.

Embora os micro-organismos entomopatógenos possam ser aplicados puros ou na forma em que são produzidos, muitas vezes tais condições não permitem a distribuição e a cobertura homogêneas e a obtenção de um controle eficiente. Estes problemas podem ser superados pelo desenvolvimento de uma formulação adequada.

4. CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS

Diversos agentes microbianos podem causar doenças em insetos, incluindo vírus, fungos, protozoários, nematóides e bactérias.

a) Vírus

A ocorrência de vírus patógenos a insetos tem sido bem documentada ao longo dos anos. Podem ser produzidos *in vivo*, através da infecção em insetos susceptíveis, ou *in vitro*, pela multiplicação de células hospedeiras. Algumas das principais dificuldades encontradas na produção de vírus entomopatogênicos é a necessidade de grandes quantidades de insetos pelo processo *in vivo*, enquanto que na produção em laboratório as células animais cultivadas são muito susceptíveis a danos mecânicos.

O mais importante grupo de vírus entomopatógenos são os baculovírus, pertencentes à família Baculoviridae, que infectam principalmente insetos da Ordem Lepidoptera (lagartas). De acordo com Volkman *et al.* (1995), os gêneros mais importantes são o *Nucleopolyhedrovirus* (vírus da poliedrose nuclear – NPV), muito utilizado para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), e o Granulovirus (vírus da granulose – GV), usado no combate à broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*).

No Brasil, um dos exemplos mais bem sucedidos de controle biológico pela utilização de vírus entomopatógenos é o da lagarta-da-soja, sendo o maior programa de uso de vírus de insetos a nível mundial (Moscardi, 1989).

A Tabela 1 ilustra alguns dos vírus entomopatógenos aplicados na agricultura.

b) Fungos

De acordo com Robbs & Bittencourt (1998), os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das doenças em populações de insetos. Cerca de

Tabela 1. — Alguns vírus aplicados no controle de pragas da agricultura.

Vírus	Inseto-alvo	Referência
Baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis</i> (AgNPV)	Lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i>)	MOSCARDI (1989)
Baculovírus <i>Spodoptera frugiperda</i> (SfNPV)	Lagarta do cartucho do milho (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	VALICENTE & CRUZ (1991)
Baculovírus <i>Spodoptera littoralis</i> (SfNPV)	Traça do algodão (<i>Spodoptera littoralis</i>)	STOCKDALE (1992)
Vírus da granulose <i>Erinnyis ello</i> (ErGV)	Mandarová da mandioca	MOSCARDI (1999)
Vírus da granulose <i>Phthorimaea operculella</i> (PoGV)	Traça da batata (<i>Phthorimaea operculella</i>)	BRIESE & PODGWAITE (1985)

700 espécies são reconhecidas como entomopatógenas; entretanto, apenas algumas delas são utilizadas atualmente em programas de controle. Algumas destas espécies são ainda capazes de parasitar diferentes tipos de ácaros, mosquitos e moscas. Estes agentes possuem a característica de serem de fácil dispersão, o que representa uma grande vantagem para sua aplicação em campo. Possuem grande capacidade de supressão de populações de pragas e grande facilidade de cultivo *in vitro*.

No Brasil, um exemplo de aplicação de bioinseticidas à base de fungos é a utilização de *Sporothrix insectorum* no combate ao percevejo da renda (*Leptopharsa heveae*), uma das pragas mais indesejadas no cultivo da seringueira. Na Região do Vale do Paraíba (SP), produtos à base do fungo *Metarhizium anisopliae* são empregados no combate à broca-dos-citrus e à cigarrinha-das-pastagens.

Alguns dos principais fungos empregados em programas de controle biológico são aqueles pertencentes aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Entomophthora* e *Aschersonia*. A Tabela 2 mostra alguns dos fungos entomopatógenos mais utilizados.

c) Protozoários

Em trabalho desenvolvido por Pasteur, em 1865, foi identificado o primeiro caso de uma doença em inseto causada por um protozoário. A doença era conhecida como “pebrina”, que atingia o bicho da seda, e o agente causal é hoje conhecido como *Nosema bombycis*. No início deste século, outro protozoário foi reconhecido como o agente etiológico de uma doença em abelha, *Nosema apis* (Rios, 1998).

São conhecidas cerca de 65.000 espécies de protozoários, entretanto, são poucas as espécies que possuem atividade inseticida. As mais importantes são encontradas no filo *Microspora* (Levine *et al.*, 1980).

A grande dificuldade encontrada para a utilização destes microrganismos

Tabela 2. — Alguns fungos aplicados no controle de pragas da agricultura.

Fungo	Inseto-alvo	Referência
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Cigarrinhas-da-cana-de-açúcar (<i>Mahanarva posticata</i> , <i>M. fimbriolata</i> , <i>M. rubicunda indentata</i>) Cigarrinha-das-pastagens Broca-de-cana (<i>Diatraea saccharalis</i>) Broca-dos-citrus (<i>Diploschema rotundicolle</i>)	ALVES (1998); MENDONÇA (1998)
<i>Beauveria bassiana</i>	Broca da coroa do trigo (<i>Listronotus bonariensis</i>)	CISTERNAS et al. (1998)
<i>Sporothrix insectonrum</i>	Percevejo da renda (<i>Leptopharsa heveae</i>)	TANZINI (1998)
<i>Nomuraea rileyi</i>	Lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i>)	BARROS et al. (1999)

como agentes biológicos de controle é a sua dificuldade de produção em larga escala. Atualmente, o único bioinseticida desta natureza disponível comercialmente é da espécie *Nosema locustae*, muito utilizado no controle de gafanhotos. Podem ser destacadas outras espécies do gênero que possuem atividade contra insetos, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. — Alguns protozoários entomopatogênicos.

Protozoário	Inseto-alvo	Referência
<i>Nosema locustae</i>	Gafanhoto	LANGE (1996)
<i>Nosema bombycis</i>	Bicho da seda (<i>Bombix mori</i>)	McLAUGHLIN (1971)
<i>Nosema apis</i>	Abelha (<i>Apis mellifera</i>)	
<i>Nosema grandis</i>	Bicudo do algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>)	

d) Nematoides

A utilização de nematoides para o controle de insetos tem sido relatada desde o início do século (Poinar Jr., 1971). São microrganismos que possuem grande capacidade de adaptação e dispersão no ambiente, além de resistência a produtos químicos e possibilidade de atuar de forma sinérgica com outros agentes entomopatogênicos, aumentando a eficiência do controle. Entretanto, sua sensibilidade às condições ambientais adversas e baixa estabilidade reduzem sua eficácia em campo.

São conhecidas sete famílias de nematóides com propriedades inseticidas, destacando-se as espécies *Romanermis culicivorax* e *Neoplectana carpocapsae*, sendo esta última espécie produzida *in vitro* em escala comercial (Ferraz, 1986).

Um exemplo de utilização deste microrganismo no Brasil é o emprego da espécie *Deladenus siricidola* no controle biológico da vespa-da-madeira *Sirex noctilio*. Este inseto se desenvolve no interior do tronco de algumas coníferas, em especial, espécies de *Pinus* spp.

De acordo com Iede *et al.* (1998), as primeiras aplicações deste agente biológico foram realizadas em 1989. A partir do isolamento da linhagem K2, em 1997, este agente tem sido utilizado em grandes quantidades pelos produtores. Atualmente, o índice de parasitismo no Brasil é muito variado, havendo locais onde a praga está totalmente controlada em áreas contínuas de 12.000 ha, com cerca de 80 % de parasitismo.

A Tabela 4 ilustra alguns exemplos de nematóides com propriedades inseticidas.

Tabela 4. — Alguns nematóides entomopatogênicos.

Nematoide	Inseto-alvo	Referência
<i>Neoplectana carpocapsae</i>	Besouro da batata (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) Traça do tabaco (<i>Heliothis virescens</i>) Traça do repolho (<i>Pieris rapae</i>) Traça do milho (<i>Heliothis zea</i>)	POINAR Jr. (1971)
<i>Deladenus siricidola</i>	Vespas (gênero <i>Sirex</i>)	BEDDING (1974)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cigarrinha da cana-de-açúcar (<i>Mahanarva fimbriolata</i>)	EL-KADI (1977)
<i>Heterotylenchus</i> spp.	Moscas	POINAR Jr. (1971)

e) Bactérias

As mais bem conhecidas bactérias entomopatogênicas estão assim classificadas: *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), *Serratia* (*S. marcescens*, *S. entomophila*), *Clostridium* (*C. bifermentans*) e *Bacillus* (*B. alvei*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*) (Thiery & Frachon, 1997).

Alguns autores as classificam como esporulantes e não esporulantes. As espécies esporulantes são mais adequadas à produção industrial e à aplicação em campo, além da menor sensibilidade dos esporos às radiações ultravioleta e condições climáticas, como calor excessivo e baixos teores de umidade, aumentando sua persistência no campo (Falcon, 1971). As espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia* são não-esporulantes, enquanto que *Clostridium* e *Bacillus* são esporulantes.

5. BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS*

Dentre as bactérias esporulantes, merecem especial destaque as espécies do gênero *Bacillus*. A espécie mais estudada e utilizada no campo é *B. thuringiensis*, que apresenta dezenas de variedades tóxicas contra insetos das Ordens Lepidoptera (lagartas), Coleoptera (besouros) e Diptera (mosquitos e moscas). A espécie *B. sphaericus* apresenta maior especificidade contra insetos da Ordem Diptera.

a) *Bacillus sphaericus*

A bactéria *B. sphaericus* (Bs) foi primeiramente descoberta em 1904 (Neide, 1904). Apenas em 1965 sua atividade contra larvas de culicídeos foi reconhecida; entretanto a cepa então descoberta (*B. sphaericus* K) não possuía uma atividade muito eficaz, o que limitou a sua utilização (Kellen *et al.*, 1965).

Atualmente, diversas linhagens tóxicas são conhecidas, e a maioria dos trabalhos utiliza as cepas 1593 e 2362, isoladas respectivamente na Indonésia (Singer, 1973) e na Nigéria (Weiser, 1984). Apresenta elevada toxicidade e especificidade contra insetos da Ordem Diptera, especialmente contra as espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles*.

Por ser inofensiva ao homem, animais e meio ambiente, sua utilização é recomendada pela Organização Mundial de Saúde em programas de saúde pública. A linhagem 2362 é amplamente utilizada em diversos programas de controle de mosquitos em todo o mundo, constituindo o princípio ativo de todos os produtos comerciais à base de *B. sphaericus* que são utilizados para o controle de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*.

É estritamente aeróbica e Gram-positiva. Não é capaz de utilizar açúcares como fontes de carbono e energia, necessitando de meios de crescimento à base de proteínas e íons Ca^{++} e Mg^{++} para a esporulação (Russel *et al.*, 1989). Apresenta esporos esféricos situados terminalmente em um esporângio distendido.

As variedades mais tóxicas às larvas de mosquitos, incluindo-se a linhagem 2362, produzem um cristal protéico em forma de paralelepípedo composto por duas proteínas de 51,4 e 41,9kDa. Ambas as proteínas são requeridas para a ação tóxica, sendo sintetizadas em quantidades equimolares durante a esporulação (Charles *et al.*, 1997). Após a esporulação, o cristal permanece associado ao endosporo, estando este complexo (endosporo+cristal) contido no exosporio.

Após ingestão do cristal, as duas proteínas são solubilizadas no estômago das larvas pela ação combinada de proteases e pH alcalino, causando danos ao sistema nervoso e ao trato digestivo, até a ocorrência de septicemia (Rios, 1998). O período

compreendido entre a ingestão da toxina e a letalidade das larvas é de até 48 horas.

As cepas menos ativas produzem um grupo de toxinas denominadas de Mtx, sendo sintetizadas apenas durante a fase vegetativa (Thanabalu *et al.*, 1991). Sua localização na célula ainda não é bem definida e possuem um modo de ação ainda desconhecido (Charles *et al.*, 1996).

É uma espécie bastante comum e de ampla distribuição, podendo ser isolada do solo de ecossistemas aquáticos ou em larvas de mosquitos mortos. Além disso, possui a habilidade de persistir em ambientes aquáticos, poluídos ou não (Baumann *et al.*, 1991). Este fato representa uma grande vantagem em se tratando de aplicações realizadas em canais, valetas ou fossas, todos contendo grandes quantidades de matéria orgânica, proporcionando um controle mais duradouro sobre as populações de larvas.

A eficácia de *B. sphaericus* no controle dos mosquitos tem sido extensamente comprovada ao longo dos anos, podendo ser citados programas de longa duração como, por exemplo, no Vale do Reno, Alemanha (Becker, 1997).

Gunasekaran *et al.* (2000) demonstraram que esta bactéria, quando aplicada em doses sub-letais contra *Culex quinquefasciatus*, além de causar mortalidade das larvas, reduzia a eficiência dos mosquitos adultos quanto à transmissão da filariose.

Diversas pesquisas tem sido desenvolvidas em todo o mundo buscando o isolamento de novas linhagens que produzam diferentes toxinas ou que estejam mais adaptadas às condições locais, com maior eficácia em campo.

Rodrigues *et al.* (1998) investigaram dez linhagens de *B. sphaericus* isoladas de solos brasileiros para o controle de vetores da malária na Amazônia – *Anopheles nuneztovari* e *An. darlingi* – e os resultados demonstraram que as cepas apresentaram maior atividade larvicida em relação à linhagem padrão 2362.

b) *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis foi isolada pela primeira vez no Japão em 1902, quando Ishawata descreveu uma bactéria esporulante que causava mortalidade em lagartas do bicho da seda (*Bombix mori*). Em 1911, Berliner relatou o mesmo tipo de bactéria atuando sobre a traça-das-farinhas (*Anagasta kuehniella*), e em 1915 a batizou de *Bacillus thuringiensis*. O pesquisador comentou a presença de um corpo de inclusão no esporo, mas não o relacionou com as propriedades inseticidas do microrganismo, mencionando ainda a possibilidade de utilizá-lo no controle das traças (Capalbo & Moraes, 1987).

O desenvolvimento de produtos à base de *B. thuringiensis* se intensificou na década

de 50, mas foi apenas em 1970 que a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, ativa contra um grande número de espécies de pragas, foi produzida comercialmente por muitas companhias de produtos agroquímicos e de fermentação (Navon, 2000). Atualmente, produtos à base desta bactéria correspondem a cerca de 90% do mercado mundial de agentes de controle biológico.

Em 1977, Goldberg & Margalit (1977) identificaram uma linhagem que apresentou atividade tóxica contra dípteros. A cepa foi isolada em Israel, a partir de larvas moribundas de *Culex pipiens*, sendo denominada *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), sendo esta a primeira bactéria utilizada em programas de controle biológico contra dípteros em todo o mundo. No Instituto Pasteur de Paris, a linhagem foi identificada como *B. thuringiensis* sorotipo H-14.

Apresenta elevada toxicidade a larvas de mosquitos pertencentes aos gêneros *Aedes* e *Culex*, sendo menos ativa contra o gênero *Anopheles*. Também possui ação tóxica contra larvas de mosquitos da família dos simulídeos (borrachudos), insetos transmissores de doenças como a oncocercose, além de causarem intenso desconforto, reações alérgicas e infecções na pele. Pode ser facilmente encontrada no meio ambiente e isolada do solo, armazéns, superfície de folhas e em habitat de insetos (Hongyu *et al.*, 2000).

A Tabela 5 apresenta as principais variedades de *B. thuringiensis* utilizadas para o controle biológico de insetos.

Tabela 5. — Principais variedades de *B. thuringiensis* utilizadas para o controle biológico de insetos.

Variedade	Inseto-alvo
<i>aizawai</i>	Lepidópteros
<i>tenebrionis</i>	Coleópteros
<i>kurstaki</i>	Lepidópteros
<i>israelensis</i>	Dípteros

A segurança de produtos à base de *B. thuringiensis* aos organismos não-alvo tem sido extensamente revisada por diversos autores. É totalmente inócua ao homem e a outros mamíferos, bem como a vertebrados aquáticos, invertebrados e plantas.

Possui metabolismo aeróbio, a glicose é usada como fonte de carbono e energia, assim como a L-arabinose, D-xilose e D-manitol, sendo que algumas cepas utilizam a sacarose.

A atividade inseticida da grande maioria das subespécies de *B. thuringiensis* está relacionada à produção de uma inclusão parasporal de estrutura cristalina denominada

de δ -endotoxina, que é sintetizada durante a esporulação. Dependendo da variedade da espécie, as δ -endotoxinas são formadas por proteínas de diferentes estruturas e pesos moleculares, variando entre 65 e 138 kDa. Estas proteínas (protoxinas) são chamadas de proteínas Cry e são identificadas de acordo com a sua maior ou menor toxicidade às diversas Ordens de insetos susceptíveis. Diferentemente do que ocorre com *B. sphaericus*, a toxina produzida pelo *B. thuringiensis* não permanece associada ao endosporo.

Por exemplo, a classe Cry1 possui maior atividade contra insetos da Ordem Lepidoptera, enquanto que cristais formados por proteínas do tipo Cry4 são tóxicos contra Diptera (Tabela 6). Estas proteínas são codificadas por diferentes genes cry, estando agrupadas em 22 classes.

Tabela 6. — Exemplos de proteínas Cry encontradas em *B. thuringiensis*.

Proteína	Formato do cristal	Tamanho da proteína (kDa)	Inseto-alvo	Referência
Cry 1	Bipiramidal	130-138	Lepidópteros	MONNERAT & BRAVO (2000)
Cry 2	Cubóide	65	Lepidópteros e Dípteros	HÖFTE & WHITELEY (1989)
Cry 3	Irregular	72-73	Coleópteros	MONNERAT & BRAVO (2000)
Cry 4	Ovóide, esférico ou retangular	128-135	Dípteros	HÖFTE & WHITELEY (1989)

A estrutura tridimensional da proteína Cry 3A de *B. thuringiensis* é organizada em três domínios: domínio I, responsável pela formação de poros no epitélio intestinal do organismo alvo; domínio II, que tem papel essencial na seletividade da toxina, estando associado à ligação da mesma ao receptor; e o domínio III, possivelmente envolvido na estabilidade estrutural da molécula (Yousten, 1996; LI *et al.*, 1991; Aronson & Shai, 2001).

Quando as larvas dos insetos ingerem estas inclusões, as protoxinas são solubilizadas e convertidas em toxinas ativas de baixo peso molecular, através de enzimas (proteases) presentes no estômago das larvas e pH alcalino. Após a ligação a receptores específicos, a toxina insere-se rapidamente na membrana plasmática de células do intestino, causando a abertura ou formação de canais ou poros e provocando um desequilíbrio osmótico pela perda da integridade da membrana.

Tais eventos conduzem à lise celular e, finalmente, à morte do inseto por inanição ou septicemia (Kumar *et al.*, 1996).

6. ASPECTOS DA FERMENTAÇÃO

Os principais componentes dos meios de cultivo para a produção de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis* são fontes de carbono e nitrogênio e elementos traços. As fermentações comerciais das bactérias entomopatógenas são realizadas em batelada ou em batelada alimentada. A escolha adequada dos ingredientes do meio é fundamental para o sucesso da produção comercial, tendo como objetivo a obtenção de uma maior atividade tóxica por volume de caldo fermentado.

Diversos substratos de baixo custo podem ser utilizados na composição dos meios. Para *B. sphaericus*, que não utiliza carboidratos como fonte de carbono, estes devem ser formulados à base de proteínas, enquanto que açúcares podem ser empregados para as linhagens de *B. thuringiensis*.

Os principais parâmetros monitorados durante o processo fermentativo são temperatura, oxigênio dissolvido, pH e concentração de açúcar. Devido ao grande consumo de oxigênio durante o cultivo, o controle deste parâmetro é muito importante, não devendo atingir valores abaixo de 20 % (Couch, 2000).

Existem controvérsias com relação à necessidade do controle de pH durante a fermentação. Segundo Couch (2000), alguns produtores utilizam meios tamponados por não possuírem um sistema adequado de controle. Outros autores verificaram um aumento na atividade inseticida dos caldos fermentados de *B. sphaericus* (Yousten & Wallis, 1987) e de *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Smith, 1982) quando a fermentação era realizada sem controle de pH.

Em bateladas alimentadas, os níveis de açúcar (para o caso de *B. thuringiensis* var. *israelensis*) não devem atingir níveis inferiores a 2 g/L. A temperatura deve ser mantida em $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; valores maiores inibem a produção das toxinas (Rowe & Argyrios, 1987), enquanto que valores menores que $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aumentam os custos de produção.

O desenvolvimento da tecnologia de produção de bioinseticidas depende basicamente de quatro etapas: i) isolamento e seleção de linhagens com maior atividade; ii) otimização do processo fermentativo, utilizando-se matérias-primas de baixo custo visando a produção em larga escala; iii) aplicação de métodos adequados de separação da biomassa; iv) desenvolvimento de formulações visando a sua aplicação em campo.

7. FORMULAÇÕES

As biomassas das bactérias inseticidas do gênero *Bacillus*, após separadas de seus caldos fermentados, são compostas por um complexo de componentes orgânicos, mais especificamente as protoxinas e os respectivos esporos. Como proteínas, as protoxinas são mais sensíveis a alterações em suas estruturas químicas e se inativam ao longo do tempo. A inativação pode ser causada por contaminação microbiana, radiação ultravioleta, enzimas proteolíticas, sensibilidade às condições de temperatura, compostos tóxicos, secagem não controlada, umidade, etc. (Rabinovitch *et al.*, 1999).

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de desenvolver formulações mais eficientes e duradouras, além de técnicas de engenharia genética com o objetivo de produzir novas combinações de toxinas, proteínas tóxicas adicionais e um maior nível de produção da toxina para aumentar a eficiência das diversas cepas existentes.

Alguns critérios gerais devem ser obedecidos para a obtenção de formulados de qualidade e comercialmente viáveis (Couch, 2000): a atividade inseticida deve ser mantida e/ou aumentada durante o processo de formulação; as formulações devem possuir um tempo de prateleira variando entre 18–36 meses sob condições de estocagem à temperatura média de 25 °C, e exposições a temperaturas acima de 30 °C por períodos prolongados devem ser evitadas; as formulações líquidas devem ser facilmente dispersas e devem garantir uma distribuição adequada do ingrediente ativo; os formulados devem ser estáveis sob condições ambientais, protegidos dos efeitos da radiação ultravioleta e devem ser adequados aos hábitos do inseto e às características dos locais onde se encontram os criadouros; os formulados devem ser economicamente viáveis, com preço competitivo no mercado.

Uma formulação adequada aumenta a eficiência do produto no campo, facilita o manuseio e a aplicação e diminui os custos de armazenamento, diminuindo a perda na qualidade. Contudo, existem poucos relatos na literatura científica sobre o estudo de formulações de micro-organismos entomopatógenos, especialmente considerando que as formulações já desenvolvidas são, em geral, mantidas sob sigilo pelas empresas que as desenvolvem.

Os componentes de uma formulação, além de serem inativos às larvas, devem envolver os cristais de protoxinas sem aumentar o tamanho da partícula, caso contrário podem não ser digeridos pelo inseto. Além disso, devem contribuir para o aumento da estabilidade, virulência, eficácia e persistência do agente de biocontrole.

As formulações também devem ser compatíveis com as técnicas de aplicação e com os equipamentos existentes. Em geral, a aplicação de inseticidas microbianos tem sido realizada com equipamentos e tecnologia desenvolvidos para os inseticidas químicos. Caso contrário, encontrarão dificuldades para concorrer no mercado e terão sua aceitação limitada.

As formulações comerciais à base de *Bacillus* entomopatogênicos disponíveis no mercado são formulações líquidas, sólidas (pós molháveis, pós, grânulos dispersíveis em água, formas encapsuladas) e óleos emulsionáveis.

8. CRITÉRIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

O principal critério de avaliação de uma formulação bioinseticida é a sua atividade tóxica ao inseto susceptível. A avaliação da presença de contaminantes deve ser rigorosamente conduzida e deve ser realizada em todas as etapas de produção, desde a fermentação até a formulação do produto final. A Tabela 7 mostra os níveis de contaminação aceitáveis para estes produtos (Couch, 2000).

Tabela 7. — Níveis aceitáveis quanto à presença de microrganismos contaminantes em produtos bioinseticidas.

Organismo	Limite
Coliformes	< 10 /g
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausente em 1 g
<i>Salmonella</i>	ausente em 10 g
<i>Streptococcus faecalis</i>	< 1x10 ⁴ /g
Leveduras e fungos	< 100 /g

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba. FEALQ. 1998.

ARONSON, A.I. & SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiology Letters 195:1–8. 2001.

BARROS, N.M., ROSSATO, M. & ONOFRE, S.B. *Nomuraea rileyi* como agente de controle microbiano da lagarta-da-soja. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle Biológico. São Paulo. Embrapa Meio Ambiente. 1999.

BAUMANN, P., CLARK, M.A., BAUMANN, L. & BROADWELL AH. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. Microbiology Reviews 55:425–436. 1991.

BECKER, N. Microbial control of mosquitoes: management of the upper rhine mosquito population as a model programme. *Parasitology Today* 13:485–487. 1997.

BEDDING, R.A. Five new species of *Deladenus* (*Neotylenchidae*) entomophagous–mycetophagous nematodes parasitic in siricid woodwasps. *Nematologica* 20:204–225. 1974.

BULL, D. & HATHAWAY, D. Pragas e Venenos no Brasil e no Terceiro Mundo. Petrópolis. Ed. Vozes. 1986.

BRIESE, D.T. & PODGWAITE, J.D. Development of viral resistance in insect populations. In: Maramorosch, K.E., Sherman, K.E. (Eds.) *Viral Insecticides for Biological Control*. Orlando. Academic Press. 1985.

CAPALBO, D.M.F. & MORAES, I. O. Produção de inseticida biológico com *Bacillus thuringiensis*. *Boletim de Pesquisa, Embrapa* 1:1–15. 1987.

CHARLES, J.F., NIELSEN–LEROUX, C. & DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annual Review of Entomology* 41:451–472. 1996.

CHARLES, J.F., SILVA–FILHA, M.H., NIELSEN–LEROUX, C., HUMPHREYS, M.J. & BERRY, C. Binding of the 51– and 42–kda individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiology Letters* 156:153–159. 1997.

CISTERNAS, E., FRANCE, A. & GERDING, M. Control de *Listronotus bonariensis* con *Beauveria bassiana* en praderas en el sur de Chile. Resumos, 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIOL), Rio de Janeiro, RJ. 1998. p.145.

COPPEL, H.C. & MERTINS, J.W. *Biological Insect Pest Suppression*. Berlin. Springer–Verlag. 1977.

COUCH, T.L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: Charles, J.F., Delécluse, A. & Nielsen–LeRoux, C. (Eds.) *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers. 2000.

DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81:5–14. 1986.

EL–KADI, M.K. Produção comercial de nematóides parasitos de cigarrinhas. *Sociedade Brasileira de Nematologia* 2:71–74. 1977.

FALCON, L.A. Use of bacteria for microbial control. In: Burges, H.D. & Hussey, N.W. (Eds.) *Microbial Control of Insects and Mites*. New York. Academic Press. 1971.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematóides entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. São Paulo. Editora Manole LTDA. 1986.

- GOLDBERG, L.J. & MARGALIT, J.A. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News 37:355–358. 1977.
- GUNASEKARAN, K., PADMANABAN, V. & BALARAMAN, K. Development of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* that survived the exposure of sub-lethal dose of *Bacillus sphaericus* as larvae. Acta Tropica 74:43–49. 2000.
- HONGYU, Z., ZINIU, Y. & WANGXI, D. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. Crop Protection 19:449–454. 2000.
- IEDE, E.T., PENTEADO, S.R.C. & LEITE, M.S.P. Utilização do nematóide *Deladenus siricidicola* (Nematoda: Neotylenchidae) no controle biológico de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: siricidae), praga de *Pinus* spp. Anais, I Congresso Latino-americano IUFRO, Valdivia, Chile. 1998.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology Reviews 53:242–255. 1989.
- KELLEN, W.R., CLARK, T.B., LINDEGREN, J.E. & HO, B.C. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology 7:442–448. 1965.
- KUMAR, P.A., SHARMA, R.P. & MALIK, V.S. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Advances in Applied Microbiology 42:1–43. 1996.
- LANGE, C.E. Protistas patógenos de insectos terrestres. In: Lecuona, R.E. (Ed.) Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. Castelar. 1996.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. Journal of Protozoology 27:37–58. 1980.
- LI, J., CARROL, J. & ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5Å resolution. Nature 353:815–821. 1991.
- MCLAUGHLIN, R.E. Use of protozoans for microbial control of insects. In: Burges, H.D. & Hussey, N.W. (Eds.) Microbial control of insects and mites. London. Academic Press. 1971.
- MENDONÇA, A.F. Controle de cigarrinhas de cana-de-açúcar com fungos entomopatogênicos. Resumos, 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIOL), Rio de Janeiro, RJ. 1998. p.398–400.

MONNERAT, R. & BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle biológico. Jaguariúna. EMBRAPA Meio Ambiente. 2000.

MOSCARDI, F. The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 4:51–56. 1989.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annual Review of Entomology 44:257–289. 1999.

NEIDE, E. Botanische beschreibung einiger sporenbildenden bacterien. Zentralblatt fuer Bakteriologie Parasitenkunde Infektions Krankheiten Hygiene Abstracts 12:1. 1904.

NOBRE, A., ANTEZANA, D. & TAUIL, P.L. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. Revista Brasileira de Medicina Tropical 27:59–66. 1994.

POINAR JR., G.O. Use of nematodes for microbial control of insects. In: Burges, H.D. & Hussey, N.W. (Eds.) Microbial control of insects and mites. London. Academic Press. 1971.

RABINOVITCH, L., SILVA, C.M.B. & ALVES, R.S.A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus entomopatogênicos*. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle biológico. Jaguariúna. EMBRAPA Meio Ambiente. 1999.

RIOS, E.M. Recuperação de esporos de *Bacillus sphaericus* em meio fermentado. (Tese de Doutorado). Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1998.

RÉGIS, L., SILVA, S.B. & MELO-SANTOS, M.A. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95:207–210. 2000.

ROBBS, C.F. & BITTENCOURT, A.M. O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. Biotecnologia 6:10–12. 1998.

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

ROWE, G.E. & ARGYRIOS, M. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology 6:87–127. 1987.

RUSSEL, B.L., JELLEY, S.C. & YOUSTEN, A.A. Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. Applied Environmental Microbiology 55:294–297. 1989.

SINGER, S. insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. Nature 244:110–110. 1973.

SINGER, S. *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. *Biotechnology and Bioengineering* 22:1335–1355. 1980.

SMITH, R.A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. *Canadian Journal Microbiology* 28:1089–1092. 1982.

STOCKDALE, H. Microbial insecticides. In: Moo-Young, M. (Ed.) *Comprehensive biotechnology, the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. The practice of biotechnology*. Pergamon Press. 1992.

TANZINI, M.R. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira com *Sporothrix*. Resumos, 6º Simpósio de Controle Biológico (VI SICONBIOL), Rio de Janeiro, RJ. 1998. p.393–397.

THANABALU, T., HINDLEY, J., JACKSON-YAP, J. & BERRY, C. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* ssi-1. *Journal of Bacteriology* 173:2776–85. 1991.

VALICENTE, F.H. & CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Circular Técnica Número 15, EMBRAPA/CNPMS. 1991.

VOLKMAN, L.E., BLISSARD, G.W. & FRIENSEN, P.D. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York. Springer Verlag. 1995.

YOUSTEN, A.A. Mosquitocidal toxins from bacteria of the genus *Bacillus*. Resumos, 5º Simpósio de Controle Biológico (V SICONBIOL), Foz de Iguaçu, PR. 1996. p.304–309.

YOUSTEN, A.A. & WALLIS, D.A. Batch and continuous culture of the mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2:277–283. 1987.

WEISER, J.A. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in Adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 139:57–60. 1984.